



*Especiación directa en biomateriales mediante técnicas no-destructivas. Técnica XAS de Sincrotrón y técnicas Hiperespectrales, para la caracterización de muestras alimentarias, trazabilidad e indicadores medioambientales.*

*Maribel Restituyo Silis*

*Tesis doctoral*

Programa de doctorado en Química

Directores: Manuel Valiente Malmagro y Montserrat López-Mesas

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

Año 2015

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor por

**Maribel Restituyo Silis**

Visto bueno, los directores

Manuel Valiente Malmagro

Montserrat López-Mesas

Bellaterra, 03/09/215

*Dedicatoria*

*Mas a Dios gracias, el cual nos lleva siempre en triunfo en Cristo Jesús, y por medio de nosotros manifiesta en todo lugar el olor de su conocimiento. 2 Corintios 2:14*

*A Dios y a mi hija*

## *Agradecimientos*

---

*Los estudios que se recogen en la presente memoria han sido financiados gracias al soporte financiero de los proyectos de investigación europeo EA610857-ORQUE SUDOE (Programa Interreg-SUDOE) y el español MINECO CTM2012-30970.*

***De igual manera se agradece las siguientes colaboraciones científicas:***

- ❖ Al laboratorio para la caracterización de materiales particulados, del departamento de química e ingeniería de materiales y medio ambiente de la Universidad de Roma la Sapienza, Italia, por su colaboración y enseñanza en el manejo y aprendizaje de la técnica basada en el uso de imágenes hiperespectrales, especialmente a sus responsables **Dra. Silvia Serranti y Prof. Giuseppe Bonifazi**.
- ❖ Al **ESRF** (European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble, Francia por la posibilidad de desarrollar los experimentos de XAS en sus instalaciones, específicamente en la beamline **BM-25** y sus responsables **Dr. Germán Castro y Carlos** por su asesoramiento técnico.
- ❖ A las empresas: Jamones Navarro, Señorío de Olivenza y la Federación de Productores de Moluscos del Delta de Ebro (FEPROMODEL), por facilitarnos todas las muestras utilizadas en este trabajo.
- ❖ Al **MAX-LAB** (Laboratory IV MAX), Universidad de Lund, Suecia, por disponer de sus instalaciones para llevar a cabo experimentos XAS en la beamline **BALDER** y su responsable **Konstastin Klementiev**, por hacer posible la adquisición de datos espectrales y por su asesoría científica en este trabajo.
- ❖ Al Sincrotrón **ALBA**, Barcelona, España, por las colaboraciones científicas que se han desarrollado haciendo posible ir más allá de los experimentos propuestos, especialmente a la línea **CLAESS** y sus responsables **Dra. Laura Simonelli, Dr. Carlo Marini y Dra. Marta Ávila**.
- ❖ Al parque tecnológico **Technopole Hélioparc**, Pau, Francia, por su incondicional ayuda y apoyo en la utilización de sus equipos y enseñanza metodológica del uso del ICP-MS y caracterización isotópica, especialmente a su responsable **Prof. Oliver Donard, Dra. Fabiane Séby y Ing. Ekaterina Epova**.

***PUBLICACIONES:***

***COMUNICACIONES A CONGRESOS***

- ❖ *Chemical speciation of trace metals in Iberian and Italian cured ham. Identification of biomarkers in the curing process, using synchrotron techniques VII Congreso Mundial del Jamón, ISBN 978-989-98363-0-3.*

- ❖ *ALBA USERS MEETING, VI conferencia del AUSE (Asociación usuarios sincrotrón España) 2013, “chemical speciation of trace metals in Iberian and Italian cured ham. Identification of biomarkers in the curing process, using synchrotron techniques”.*
- ❖ *VII AUSE Congress and II ALBA User's Meeting 2015, Speciation of iron and zinc in cured ham to assess the curing process. (2015)*

#### **PONENCIAS EN REUNIONES DE PROYECTO**

- ❖ *Chemical speciation of trace metals in Iberian and Italian cured ham. Identification of biomarkers in the curing process, using synchrotron techniques ORQUE SUDOE Project. Pau, Francia.2013*
- ❖ *Speciation of heavy metals in Mollusks grown in Mediterranean Sea, using Synchrotron Technique. ORQUE SUDOE Project. Madrid, España. 2014.*

### *Agradecimientos personales*

*Primeramente, quiero agradecer a mi buen Padre Dios, por haberme dado la fuerza, paciencia y tolerancia para lograr este objetivo en mi vida y culminar con esta tesis doctoral, gracias mi Señor.*

*A mí querida hija Eimy, por su amor, apoyo y confianza, que me brinda día a día, y que gracias a sus oraciones me ayuda a levantarme y avanzar siempre.*

*A mis queridos amigos Yasmina y Fernando Villareal, que son como unos padres para mí, los cuales siempre han confiado en mí y me han brindado su apoyo incondicionalmente en mi vida, muchas gracias.*

*A mis buenas amigas Leonor López y Dalia Giménez, por sus oraciones y sus palabras de ánimo que me hacían seguir adelante.*

*Al grupo GTS, especialmente a los directores de esta tesis, por haberme permitido llevar a cabo este trabajo de investigación en el grupo y por brindarme su apoyo técnico y científico, a mis compañeras, Angélica María Candela, Liu He, Tong Liu, Maria Dolor Mir y Nurlyn y Maria Angels, Thank you for all.*

*Al Profesor Jordi Coello Bonilla, por su ayuda incondicional en el análisis de datos multivariante y por la transferencia de conocimientos. Muchas gracias*

*A los Pastores Gregorio Reyes y Ascensión Moreno (Susi) por sus oraciones y su apoyo.*

*A la familia Cabanillas, por brindarme su amistad incondicional, estando presente siempre ayudándome a superar momentos difíciles.*

*A mi gran familia Cristiana que Dios me ha permitido tener durante todos estos años de diferentes naciones, especialmente a la que se reúne en Casa de Adoración (Sabadell), por su apoyo, oraciones y amistad que muchas /os me han brindado, que si me pongo a mencionar no terminaría, gracias a todos, Dios les bendiga.*

*Al personal de IPREM, especialmente al Prof. Oliver Donard, Dra. Fabiane Séby, Dra. Chistelle Bonnemason-Carrere, Ing. Ekaterina Epova, por su apoyo incondicional y su acogida el tiempo que estuve trabajando con ellos. Thank you so much.*

*A los Doctores German Castro y Kontantin Klemetiv, por su apoyo e interés a lo largo de mi trabajo de investigación y transferencia de conocimientos. Thank you.*





## INDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Especiación en alimentos .....	3
1.1.1 Definición de especiación.....	3
1.1.2 Especiación y Biodisponibilidad .....	5
1.1.3 Métodos de análisis de especiación metálica .....	9
1.1.3.1 Métodos de especiación Directa.....	10
1.1.3.2 Métodos de especiación convencionales de extracción.....	13
1.1.4 Carácter esencial y toxicidad de los metales en alimentos.....	15
1.1.4.1 Importancia de la especiación en alimentos.....	16
1.1.5 Estudio de la trazabilidad en alimentos.....	16
1.1.5.1 Definición de trazabilidad .....	16
1.1.5.2 Características de la trazabilidad.....	17
1.1.5.3 Estudio de marcadores para la trazabilidad de productos cárnicos.....	17
1.1.5.4 Estudio de la biodisponibilidad de los metales en moluscos .....	19
1.2 Técnicas analíticas.....	20
1.2.1 Introducción al concepto de Imagen Hiperespectral (del inglés, Hyperspectral imagen, HSI).....	21
1.2.1.1 Fundamentos de la técnica .....	22
1.2.1.2 Concepto básico de imagen hiperespectral .....	25
1.2.1.3 Adquisición de la imagen hiperespectral.....	27
1.2.1.4 Corrección de la imagen hiperespectral.....	27
1.2.1.5 Pre-procesamiento de la imagen hiperespectral.....	28
1.2.1.6 Procesamiento de la imagen (Tratamiento de los datos).....	31
1.2.1.7 Herramientas de visualización .....	31
1.2.1.7.1 Algoritmos de clasificación no-supervisados (IsoData).....	32
1.2.1.7.2 Algoritmo de clasificación supervisadas.....	33
1.2.2 Radiación de sincrotrón.....	34
1.2.2.1 Fundamentos teóricos de la radiación sincrotrón.....	36
1.2.2.2 Espectroscopia de absorción de rayos X (XAS) .....	37

1.2.2.3 Absorción de rayos X Cercano al Borde de Absorción (del inglés, X <sub>ray</sub> Absorption Near Edge Structure, XANES) .....	40
1.2.2.3.1 Tratamiento de datos XANES.....	40
1.2.3 Procesamiento o análisis de datos.....	42
1.2.3.1 Análisis de Componentes Principales (del inglés, Principal Component Analysis, PCA).....	43
1.2.3.2 Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (del inglés, Partial Least Squares-Discriminat Analysis, PLS-DA).....	47
1.2.3.3 Análisis mediante el ajuste de la combinación lineal (del inglés, Lineal Combination Fitting, LCF).....	48
Referencias del capítulo 1.....	50
2. OBJETIVOS.....	56
2.1 Objetivo general.....	56
2.2 Objetivos específicos.....	56
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	57
3.1 Preparación de las muestras.....	57
3.1.1 Jamón curado.....	58
3.1.2 Selección de las muestras.....	58
3.1.3 Metodología empleada para el estudio mediante ICP-MS.....	59
3.1.4 Metodología empleada para el estudio por dilución isotópica.....	61
3.1.5 Metodología empleada para el estudio de imágenes hiperespectrales.....	62
3.1.5.1 Metodología empleada para el estudio mediante la técnica sincrotrón.....	69
3.1.6 Moluscos.....	75
3.1.6.1 Selección de las muestras.....	75
3.1.6.2 Metodología empleada para el estudio mediante ICP-MS.....	78
3.1.6.3 Metodología empleada para el estudio mediante la técnica de sincrotrón.....	79
Referencias del capítulo 3.....	86
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	88
4.1 Jamón curado.....	88

4.1.1	<i>Resultados del estudio mediante ICP-MS.....</i>	88
4.1.2	<i>Resultados del estudio mediante Dilución isotópica.....</i>	90
4.1.3	<i>Resultados del estudio mediante imágenes hiperspectrales.....</i>	92
4.1.4	<i>Resultados del estudio mediante técnica sincrotrón.....</i>	100
4.2	<i>Moluscos.....</i>	107
4.2.1	<i>Resultados del estudio mediante ICP-MS.....</i>	107
4.2.2	<i>Resultados del estudio mediante Técnica del sincrotrón.....</i>	113
4.2.2.1	<i>Resultados para el estudio del Arsénico.....</i>	113
4.2.2.2	<i>Resultados para el estudio del zinc.....</i>	118
	<i>Referencias del capítulo 4.....</i>	123

5.	<i>Conclusiones generales.....</i>	124
----	------------------------------------	-----

#### *Anexos*

*Anexo I: Trace-element composition and stable-isotopic ratio for geographical origin assignment of Iberian, French, Italian, and Portuguese dry-cured ham.*

*Anexo II: Spectral study of dry-cured ham using a hyperspectral imaging system in the near infrared (NIR).*

*Anexo III: Speciation of Iron and Zinc in Iberian cured ham by XANES.*

*Anexo IV: Intercomparison of Arsenic species in mollusks from coastal region SUDOE using LC-ICP-MS and Synchrotron technique.*

*Anexo V: Structural study of zinc site in metallothioneins of molluscs using XANES*

*Anexo VI: Figuras y tablas.*

*Anexo VII: Procedimiento de liofilización*

*Anexo VIII: Ficha de los datos de control de mejillones*

*Anexo IX: Referencia BCR 710*

*Anexo X: Certificados de análisis de la producción de las metalotioneinas.*

## RESUMEN

*El objetivo del presente trabajo es desarrollar metodologías para la determinación de biomarcadores en productos alimenticios específicos para evaluar tanto su trazabilidad, p.e, el jamón curado, como su actuación como indicadores de la contaminación ambiental p.e., moluscos de mar (ostras y mejillones).*

*Las metodologías se han basado en la especiación química de algunos elementos identificados, como elementos clave en las muestras, prestando atención particularmente a las metodologías basadas en la observación directa de las muestras.*

*Incluyendo el estudio de imágenes hiperespectrales (HSI), XANES (Sincrotrón) y dilución isotópica de las muestras y análisis por ICP-MS.*

*Entre los principales resultados para el jamón curado, cabe destacar el desarrollo de un modelo de clasificación por PLS-DA para los espectros obtenidos por HSI. La PLS-DA se constituyó con dos factores 86% y 90%, respectivamente. Cuyos valores de predicción están en el rango de 0,70 a 1,30 (RMSEC=0.114) para el jamón ibérico y un 1,70 a 2,30 para el jamón italiano (RMSEC=0.116), con una  $r^2$  de la CV=0.947, pudiendo diferenciarse por su origen*

*Respecto a la búsqueda de biomarcadores para la trazabilidad del jamón curado, se realizó la especiación de Fe y Zn utilizando la técnica de sincrotrón XANES en muestras de diferentes tiempos de curado. Para el Fe, la especiación se basó en los estados de oxidación  $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$ . Para  $Fe^{+2}$ , no se identificaron especies orgánicas. Las especies inorgánicas se ajustaron a la estructura del compuesto  $(Fe(NH_4)_2(SO_4)_2)$  donde el Fe está unido a átomos de S y N. Éste compuesto podría explicarse por el proceso de proteólisis, ya que su contribución disminuye cuando aumenta el tiempo de curado en la muestra. Para  $Fe^{+3}$  se encontró que la principal especie inorgánica es similar al compuesto  $FeCl_3$ , donde su contribución al inicio del proceso de curado (03-14 meses) presenta diferencias importantes en diferentes zonas de una misma muestra, presentando mayor contribución en la parte exterior. Para los demás tiempos de curado (26 a 40 meses) no se observaron diferencias entre la zona exterior e interior. Las especies orgánicas identificadas para  $Fe^{+3}$  fueron compuestos porfirínicos (mioglobina y hemín) siendo mioglobina el compuesto mayoritario. En resumen, el estudio las diferentes especies de Fe lo hacen ser un buen candidato como biomarcador de la trazabilidad del tiempo de curado de este tipo de jamón. En el caso de Zn, la especiación está basada en la naturaleza de las especies orgánicas e inorgánicas, donde no se muestran variaciones importantes en la contribución de estos compuestos en el periodo de curación, (cualquier alteración puede ser atribuida a factores externos no asociados al proceso de curación).*

*Por otro lado, mediante el análisis de dilución isotópica se pudo diferenciar entre el origen del jamón curado, diferenciado entre ibérico, italiano y portugués. Cada región es isotópicamente diferente del resto, por tanto, este estudio proporciona la interacción e información geográfica para cada región, de donde se obtienen los cerdos utilizados para la producción de los jamones curados.*

*En cuanto a los moluscos, fueron evaluadas la especiación de As y Zn debido a la toxicidad de sus especies (As) y el riesgo de bioacumulación (Zn). La especiación se llevó a cabo utilizando la técnica de sincrotrón XANES. En el caso de As, arsenobetaina fue el principal arsénico compuesto identificado, siendo entre 70%-96% del arsénico total. Para Zn, más de 50%, de las contribuciones de sus especies se atribuye a las metalotioneínas, al demostrar que el Zn está unido al átomo de azufre de la descomposición de los aminoácidos y no a restos de azufre inorgánicos.*

*Por último, una de las principales aportaciones de la investigación de los moluscos ha sido la producción de un material de referencia para el control de la calidad del medio ambiente de las costas marinas, obtenido en un lugar de muestreo de los moluscos analizados en este trabajo de investigación. La caracterización definitiva de ese material de referencia está todavía en curso.*

## SUMMARY

*The aim of the present thesis work is to develop methodologies for determining biomarkers in specific food products to evaluate either their traceability, e.g. cured ham, or their role at the environmental observatory, e.g. sea mollusk (oysters and mussels ) as pollution indicators.*

*A set of methodological guidelines based on the speciation of some elements identified as key differential for the indicated samples have been developed. Particular attention has been paid to the methodologies nature based on the direct observation of the target samples.*

*In this concern, methodologies have been developed including the application of Hyperspectral Imaging (HSI), XANES (Synchrotron) and Isotope Dilution to a successful characterization of the samples.*

*For the cured ham, the main results obtained, include the development of a classification model by PLS-DA for the spectra obtained by HSI. The PLS-DA is constituted by two factors 86% and 90% respectively. Predicting values were obtained in the range of 0.70 to 1.30 for Iberian ham and a 1.70 to 2.30 for Italian ham, the regression statistics showed an RMSEC of 0.114, an RMSECV of 0.116 and  $r^2$  from the CV of 0.947, so they can be differentiated by their origin*

*To search for specific chemical biomarkers of cured ham traceability, speciation of Fe and Zn was performed using XANES synchrotron technique in samples of different curing times. For iron, speciation was based in the oxidation states  $Fe^{+2}$  and  $Fe^{+3}$ . For  $Fe^{+2}$ , no organic species were identified, but inorganic species of similar structure to  $(Fe(NH_4)_2(SO_4)_2)$  where Fe interact to an S and N atom were found. This compound could be explained from the proteolysis process, because its contribution to the sample spectra decreases when curing time increases. For  $Fe^{+3}$  the majority inorganic species was found to be similar to  $FeCl_3$ , where its contribution at the beginning of the curing process (03-14 months) presented important differences in different parts of the ham, observing the major contribution in the outer region of the ham samples. For the rest of curing times (26 to 40 months) no differences were observed between inner and outer region. In addition, the organic species identified for  $Fe^{+3}$  were porphyrin compounds (myoglobin and hemin) being myoglobin the major compound found. In this sense, it has been demonstrated that the identification of Fe species is a good methodology in order to establish the traceability of the curing process for dry-cured ham. In the case of Zn, the speciation was based on the nature of organic and inorganic species, but the contribution of the species did not present any change throughout the different curing time samples, thus any change in the contribution of the specie can be attributed to external factors other than the curing process.*

*On the other hand, by the Isotopic Dilution analysis it was possible to differentiate between the origin of the dry-cured ham, such as Iberian, Italian and Portuguese ham. Each region is isotopically different from the rest, thus this study provides geographical interaction and information for each region, where the pigs are obtained from for the production of cured hams.*

*Concerning mollusks, speciation of As and Zn were considered due to the toxicity of their species (As) and the risk of bioaccumulation (Zn). Speciation was carried out using XANES synchrotron technique. In the case of As, arsenobetaine was the main species of Arsenio-compounds found in the samples analyzed, which ranged from 70% to 96% of the total arsenic. In the case of Zn, more than 50%, of the contributions of the Zn-species were attributed to metallothioneins, demonstrating that Zn is attached to the sulfur atom from the breakdown of amino acids and not from inorganic Sulphur moieties.*

*Finally, one of the principal outputs of the mollusks research has been the production of a reference material for the environmental monitoring of sea coasts, obtained from a sampling location of the mollusk analyzed in the present work and as result of the analysis performed. The final characterization of such reference material is still in progress.*

The background features a repeating pattern of chemical symbols including 'Ca', 'Mg', 'Fe', 'Zn', 'Cu', 'Pb', 'Hg', 'Cd', 'Mn', 'Ni', 'Co', 'Al', 'Si', 'K', 'Na', 'S', 'C', 'O', 'N', 'H', 'I', 'Br', 'Cl', 'F', 'Li', 'Be', 'B', 'C', 'N', 'O', 'F', 'Cl', 'Br', 'I', 'S', 'Se', 'Te', 'P', 'As', 'Sb', 'Bi', 'V', 'Nb', 'Ta', 'Cr', 'Mo', 'W', 'Re', 'Os', 'Ir', 'Pt', 'Au', 'Ag', 'Hg', 'Tl', 'Pb', 'Bi', 'Po', 'At', 'Rn', 'Fr', 'Ra', 'Ac', 'Th', 'Pa', 'U', 'Np', 'Pu', 'Am', 'Cm', 'Bk', 'Cf', 'Es', 'Fm', 'Md', 'No', 'Lr'. A central purple rounded rectangle with a dark border contains the text.

**1.**

***INTRODUCCIÓN***

## 1. Introducción

*Se ha elegido como material de estudio de la presente tesis dos biomateriales de gran interés tanto en el ámbito alimenticio como en el área socio económica, los cuales son el jamón curado y los moluscos bivalvos. Ambos productos se han estudiado con objetivos diferenciados, así en el caso del jamón curado los estudios realizados han tenido como objetivo la trazabilidad del mismo, y en el caso de los moluscos bivalvos se han utilizado como biomarcadores medioambientales de las costas en las que se han recogido las muestras. Ambos biomateriales son matrices orgánicas complejas, donde cualquier análisis de especiación química se debe procurar una mínima interferencia que modifique la naturaleza de las especies químicas existentes en las muestras, por tanto, el hecho de utilizar técnicas de especiación directa constituye una herramienta muy útil a la hora de identificar las especies químicas debido a que en la mayoría de los casos, no es necesario una separación previa del analito a estudiar.*

*En el caso del jamón curado, se han obtenido muestras de diferentes regiones europeas; España e Italia, y por otro lado, los moluscos analizados son obtenidos en el área del Sudoeste Europeo (considerada por el proyecto ORQUE SUDOE), que incluye las costas de Portugal (Sado y la Aveiro), el cantábrico (Ostranor y Urdabai), el Mediterráneo (Delta del Ebro) y costas de Francia (bahía de Arcachon y La Rochelle).*

*El jamón curado es un producto tradicional del área mediterránea. En España constituye uno de los principales motores de la industria cárnica nacional, habiéndose convertido en el producto cárnico estrella de aquellos que se obtienen del cerdo [1]. La autenticidad de estos productos constituye una preocupación para la sociedad industrial y un tema de investigación para la industria cárnica, ya que estos productos son elaborados sin la clásica adición de sales nitrificantes. Tratar de esclarecer las características físico-químicas y la identificación de biomarcadores que puedan establecer un patrón de trazabilidad ha sido un objetivo de investigación de los últimos años.*

*Entre los trabajos llevados a cabo en esta tesis, para el jamón curado, incluye la construcción de un modelo de clasificación entre dos tipos diferentes de jamones curados, el Ibérico y el Italiano mediante Imagen Hiperespectral (HSI) y la especiación de dos*

## 1. INTRODUCCIÓN

*elementos clave identificados durante su proceso de curación (hierro y zinc) mediante la técnica de sincrotrón, como biomarcadores.*

*En el caso de los moluscos, cuyo uso como biomarcadores del ecosistema acuático, es bien conocido, las ostras y mejillones fueron los moluscos utilizados en este trabajo, obtenidos de los diferentes puntos de muestreo mencionados anteriormente. En el medio marino, los moluscos bivalvos han sido ampliamente utilizados para evaluar el estado natural de los ecosistemas acuáticos, ya que tienen la capacidad de bioacumular en sus tejidos los contaminantes presentes en el medio; su carácter sésil y filtrador los adecua para ser empleados como reveladores o centinelas de la contaminación en el área en la que habitan, esta principal característica de acumulación, hace que puedan ser considerados como organismos representativos de lo que sucede en una región determinada [2].*

*El impacto contaminante en los ecosistemas acuáticos debido a la introducción de materiales provenientes de las actividades humanas, industriales y el desarrollo urbanístico de centros poblados situados en áreas costeras, ha venido incrementándose en los últimos años. Los moluscos, pueden recuperarse rápidamente de los residuos orgánicos demandantes de oxígeno y de calor excesivo, por una combinación de dilución y descomposición bacteriana. Este proceso natural de recuperación funciona solo si los cursos de agua no están sobrecargados de contaminantes. Sin embargo, estos procesos normales no eliminan los compuestos inorgánicos. Entre las sustancias inorgánicas están los metales pesados, que han llamado la atención debido a los efectos nocivos que éstos producen, por ser además altamente persistentes y porque su peligrosidad en los organismos radica en ser tóxicos en pequeñas concentraciones. Así mismo se caracterizan por tener un origen tanto natural como antropogénico. Además, tienden a bioacumularse, lo que significa un aumento de su concentración en los organismos con el tiempo [2].*

*No obstante, el uso de un organismo vivo, como es el caso de los moluscos, como bioindicador de la contaminación de metales, reflejará únicamente las especies biodisponibles de estos metales en el interior de su organismo y de los cuales una parte de estos elementos son considerados como esenciales para su metabolismo, como son el cobre, hierro y zinc, sin embargo una elevada concentración de estos metales puede revelar un proceso anormal en el funcionamiento de dicho organismo [3].*



## **1.1 Especiación en alimentos**

### **1.1.1 Definición de especiación**

*En la actualidad se acepta de forma generalizada que la distribución, movilidad, disponibilidad biológica y toxicidad de los elementos químicos no es función de la concentración total de los mismos, sino que dependen de la forma química en la que se encuentren [3, 4]. Es necesario conocer las especies químicas de los elementos para comprender las reacciones químicas y bioquímicas en las que intervienen, y por lo tanto, obtener información relativa al carácter esencial y tóxico de los elementos químicos. Los elementos, generalmente en función de su estado de oxidación y del medio, forman parte de distintas moléculas, por lo que los análisis de especiación se convertirán en una herramienta esencial para la evaluación de riesgos en el medioambiente, permitiendo que se realicen diagnósticos y controles de los elementos trazas más efectivos. En última instancia, este tipo de investigación puede dar lugar a una legislación ambiental basada en la concentración máxima permisible de especies químicas, en vez de una legislación basada en concentraciones totales de los elementos [5-8].*

*El término “especie química” ha sido definido por La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés, International Union for Pure and Applied Chemistry, IUPAC) en sus recomendaciones del año 2000 [9]. En estas recomendaciones se describe la “especie química” como la forma específica de un elemento definida como su composición isotópica, su estado electrónico o de oxidación y/o su estructura compleja o molecular. En consecuencia, la “especiación de un elemento” se define como la distribución de un elemento entre especies químicas definidas en un sistema. Para determinar la especiación, se define el “análisis de especiación” como la actividad analítica de identificación y/o medida de las cantidades de una o más especies químicas individuales en una muestra [3, 4].*

*Por consiguiente, se pueden considerar diferentes especies:*

- 1) La composición isotópica*
- 2) El estado de oxidación*
- 3) Los compuestos inorgánicos y orgánicos y sus complejos*
- 4) Las especies organometálicas*
- 5) Los compuestos y complejos macromoleculares*

## 1. INTRODUCCIÓN

*Algunos de estos niveles estructurales son más importantes para la evaluación del riesgo que otros. Como por ejemplo, la composición de los isótopos estables de un elemento es importante tanto desde el punto de vista teórico como desde el punto de vista físico y en química ambiental, aunque en general, su importancia para la evaluación del riesgo sobre la salud humana es mínima, así mismo, la especiación elemental a nivel macromolecular posee una gran importancia biológica, fisiológica, bioquímica y sobre la nutrición, pero su importancia sobre la toxicidad ambiental es menor. Por otra parte, el estado de valencia de los elementos así como la especiación organometálica inorgánica y covalente son de gran importancia para la determinación de la toxicidad de los metales y semi-metales, de gran importancia en la alimentación y en las áreas clínicas y biológicas [10].*

*Los procedimientos analíticos que no conducen a la identificación de especies químicas pero permiten caracterizaciones de grupos de especies no se consideran que sean propiamente dicho "análisis de especiación". Para estos casos la IUPAC en sus recomendaciones emplea el término "fraccionamiento", que se define como el proceso de clasificación de un analito o un grupo de analitos de una cierta muestra de acuerdo a sus propiedades físicas (por ejemplo: tamaño o solubilidad) o químicas (por ejemplo: reactividad o tipo de enlace). El término fraccionamiento coincide con dos de los enfoques principales dados a la especiación en la literatura, que son conocidas como especiación operacional y especiación funcional. En ambos casos se hace una caracterización de diferentes grupos de compuestos en función de la operación analítica realizada (operacional) o bien que la caracterización de los grupos se realice en función de su papel en las rutas bioquímicas (funcional) [11-13].*

*Existen autores que consideran que la definición de especiación recomendada por la IUPAC es apropiada para especiación en muestras líquidas, pero relega a la mayoría de los estudios realizados en sólidos, sedimentos y materiales, tanto geoquímicos como biológicos, del campo de la especiación a la categoría de metodología de fraccionamiento [14].*

*Las dos principales áreas de aplicación de los análisis de especiación son la especiación medioambiental y la especiación biológica/médica. En el primer caso se evalúa el riesgo medioambiental mediante la determinación de especies potencialmente peligrosas, y en el segundo caso se esclarecen los mecanismos de biotransformación de las especies inorgánicas y los iones metálicos inorgánicos [15, 16]. En ambos casos las especies que se*

*estudian y los problemas analíticos que hay que resolver son muy similares, siendo por tanto una distinción en la aplicación más que en el tipo de especiación.*

*Existen, diferentes tipos de especiación:*

- *Especiación física, que se refiere al tamaño que puedan presentar las partículas contaminantes.*
- *Especiación química, se refiere a las diferentes formas químicas en las que se expresa un elemento en diferentes medios y es la que se evaluará en este trabajo de tesis. [17,18].*

### **1.1.2 Especiación y Biodisponibilidad**

*Como se ha comentado, se sabe que la concentración total de un metal no es suficiente información para indicar sus efectos al medioambiente y/o a la biota [19]. Gracias a numerosos estudios se sabe que, la toxicidad de estos metales pesados es proporcional a la facilidad de ser absorbidos por los seres vivos. Un metal disuelto en forma iónica puede absorberse más fácilmente que estando en forma elemental, y si ésta se halla en forma reducida puede ser oxidada y retenida por diversos órganos [19]. No obstante, puede determinarse la concentración total de metales, que nos proporcionará una medida general del nivel de contaminación, y la especiación, que nos dará información de la biodisponibilidad y la movilidad de cada especie del metal encontrada.*

*De manera general, podemos definir biodisponibilidad como el grado de absorción de una sustancia por un organismo vivo [17]. En el caso de los metales, la biodisponibilidad se refiere a la afinidad de un contaminante para ser absorbido mediante procesos biológicos activos o procesos pasivos de tipo físico o químico. Hay algunos factores fisicoquímicos como la temperatura, la salinidad, la presencia o ausencia de agentes complejantes, la presencia o ausencia de otros metales y factores propios de los organismos, como el grado de impermeabilidad superficial, la etapa nutricional, etc., entre otros, que pueden determinar la biodisponibilidad de los metales hacia los organismos. En cualquier caso, la*

## 1. INTRODUCCIÓN

*biodisponibilidad de los metales va a estar íntimamente ligada y va a depender de su especiación química.*

*Los ecosistemas acuáticos se emplean frecuentemente para describir la conducta de los contaminantes en relación con los sistemas biológicos acuáticos [20]. En el caso de los moluscos, su relación con los metales pesados pueden hacer que estos se bioacumulen, biomagnifiquen o bioconcentren. La **bioacumulación** hace referencia al balance entre la cantidad de metal incorporado en un organismo y la cantidad que éste es capaz de eliminar. Como consecuencia de dicho balance se puede producir un aumento o una disminución neta del contenido metálico en el organismo. Este término tiene en cuenta el hecho de que aunque la dosis puntual de metales pesados esté por debajo de valores que puedan producir efectos adversos sobre los organismos, sin embargo la continua acumulación de metales puede alterar balance metálico ingreso/excreción, haciendo el valor acumulado supere al valor excretado, produciendo así que los niveles de los metales pesados en el organismo se incrementen con el tiempo hasta valores en los que se manifiesten efectos adversos. De forma genérica, la bioacumulación de metales pesados en organismos acuáticos aumenta bajo determinadas circunstancias, entre las que destacan el menor peso corporal (estadios larvarios y juveniles), menor salinidad, mayor temperatura del agua, ausencia de metales competidores (alcalinos y alcalinotérreos) y mayor proximidad a la superficie del agua [21]. Puesto que las concentraciones de metales pesados en las zonas costeras, bahías y estuarios son notablemente mayores a las que se encuentran en aguas oceánicas, el riesgo es consecuentemente mayor. En ciertos casos, las consecuencias han sido tan graves que ha sido fácil establecer las relaciones causa-efecto, lo que facilita la identificación del problema y el establecimiento de las acciones correctoras oportunas. Aunque las concentraciones de metales pesados en la mayoría de los sistemas costeros y de estuario suelen encontrarse por debajo de niveles en los que se han comprobado sus efectos tóxicos y letales sobre los organismos acuáticos, en ensayos de laboratorio se han encontrado indicios de efectos a medio-largo plazo de metales pesados sobre los organismos vivos a concentraciones subtotales por efecto, principalmente, de fenómenos de bioacumulación [17].*

La **biomagnificación** se produce por el incremento en la concentración de un contaminante en los organismos a medida que asciende en su posición en la cadena trófica. Así, la cantidad de metal retenida por un organismo es asimilada directamente por su depredador, que a su vez puede servir de alimento a otro organismo situado en un nivel superior de la cadena trófica, con el consiguiente incremento en la cantidad de metal acumulado por este último. Es difícil documentar los posibles casos de biomagnificación debido a los inconvenientes que se tienen para disponer de todos los organismos que componen la dieta del depredador en la cadena trófica de un ecosistema en particular, y además es difícil correlacionar diferentes especies situadas a distintos niveles con un sistema idéntico de captación del contaminante, una distinta exposición (longevidad) y diferente fisiología (destoxificación). Solo algunos casos, con metales como Hg (en Canadá) y As (en Alemania), han podido señalarse como verdaderos procesos de biomagnificación [22].

El término **bioconcentración** tiene en consideración la relación existente entre la incorporación de metales al organismo vivo y el medio abiótico en el que habita; este parámetro es más fácil de determinar que el de bioacumulación. El grado en el cual un metal se concentra en un organismo acuático viene dado por el factor de enriquecimiento (FE), que se define como el cociente entre la concentración de metal en el material biogénico y la concentración del metal en el agua [23]. Es de destacar que el fitoplancton y zooplancton, base fundamental de la cadena trófica en los sistemas acuáticos, presentan unos factores de enriquecimiento notables para ciertos elementos. Otros organismos que sobresalen por sus altos niveles de enriquecimiento son los moluscos; los peces también acumulan metales, aunque con factores de enriquecimiento notablemente menores a los anteriores organismos [24]. Así, cada vez cobra más importancia la evaluación de la acumulación de metales pesados en organismos acuáticos a través del análisis químico del contenido metálico en sus tejidos, con la doble intención de investigar la distribución y comportamiento de los metales en relación con la biota acuática, además de preservar tanto las especies animales como la salud humana, puesto que muchos de estos organismos sirven de alimento. Se define **biodisponibilidad** como la afinidad de un contaminante para ser absorbido o adsorbido por un organismo vivo, atravesando las barreras biológicas (membranas celulares o epitelios compuestos por una doble membrana lipídica con moléculas proteicas y canales cargados electroquímicamente), mediante

## 1. INTRODUCCIÓN

procesos biológicos activos o procesos pasivos de tipo físico o químico. No obstante, algunos científicos diferencian entre disponibilidad externa o “bioaccesibilidad” y “biodisponibilidad interna” [25, 26], considerándose una sustancia **bioaccesible** a aquella que puede entrar en contacto con el organismo y ser absorbidas, siendo las sustancias biodisponibles aquellas que tras ser absorbidas por el organismo pueden interactuar con las moléculas u órganos diana. Factores fisicoquímicos como la temperatura, la salinidad, la presencia o ausencia de agentes complejantes, la presencia o ausencia de otros metales y factores propios de los organismos, como el grado de impermeabilidad superficial, la etapa nutricional, etc., entre otros, determinan la biodisponibilidad de los metales hacia los organismos. En cualquier caso, la biodisponibilidad de los metales va a estar íntimamente ligada y va a depender de su especiación química.

En general se considera que las especies metálicas más biodisponibles son las disueltas, y sobre esta base se han desarrollado en los últimos 20 años modelos de equilibrio, como el modelo de la actividad del ion libre (del inglés free ion activity model, FIAM), el modelo del ligando biótico (del inglés biotic ligant model, BLM) o el modelo húmico acuoso de Windermere (del inglés, Windermere humic aqueous model, WHAM), para describir la biodisponibilidad de los metales en los sistemas ambientales, a pesar de que éstos son siempre dinámicos y rara vez están en equilibrio [27]. Estos modelos se basan en la premisa que la bioacumulación de los contaminantes no es más que la consecuencia de los equilibrios termodinámicos entre las especies presentes en disolución en el medio y en los tejidos de las plantas y los microorganismos. Este equilibrio se establece por difusión pasiva, y cualquier proceso de regulación interna puede provocar desviaciones del equilibrio. Estos modelos implican que a partir de estos equilibrios, controlando los niveles de contaminantes en disolución, se puede predecir en base a los equilibrios de partición las concentraciones en los microorganismos. Estos modelos de equilibrio presentan deficiencias para explicar la biodisponibilidad de los metales en los ecosistemas, pues no tienen en cuenta procesos que pueden reducir las concentraciones biodisponibles de metal, como pueden ser los efectos de competencia de las especies, las reacciones de complejación, la complejidad existente en los procesos de transferencia a través de la membrana biológica (pueden existir varios lugares de transporte para una misma especie, así como un único

sitio de transporte para varias especies) y finalmente hay que considerar que los organismos disponen de múltiples estrategias para asimilar o eliminar el metal [27].

### **1.1.3 >>Métodos de análisis de especiación metálica**

*La especiación de metales en muestras medioambientales es un problema analítico difícil, debido a: [28]*

*(1) Las dificultades asociadas a la separación o aislamiento de la especie de interés de las matrices naturales que presentan una elevada complejidad.*

*(2) La mayoría de las técnicas de especiación disponibles provocan cambios en los equilibrios existentes entre las distintas formas químicas presentes en el sistema de estudio.*

*(3) A menudo no se dispone de muestras de referencias adecuadas para la validación de los análisis de especiación.*

*(4) Las bajas concentraciones que presentan las especies en la mayoría de las muestras requiere una alta sensibilidad y selectividad para su determinación que pocos procedimientos analíticos poseen.*

*Aun así, se han realizado importantes avances en el campo de los análisis de especiación durante los últimos 20 años, de modo que actualmente es posible realizar análisis de especiación para casi cualquier elemento, aunque no para todas las especies de cada elemento [29]. Teniendo en cuenta las consideraciones realizadas hasta el momento, el procedimiento que se seleccione para este tipo de análisis debería ser capaz de distinguir entre formas químicas diferentes de un mismo metal y entre formas químicas análogas de metales distintos, algunas o todas en concentraciones muy bajas. Habría, por tanto, que disponer de métodos analíticos válidos al nivel de trazas o sub-trazas y específicos para cada especie. Sin embargo, no siempre se dispone de las técnicas adecuadas con tan elevada sensibilidad. Por ello, se suelen separar primero en una o varias etapas las distintas especies, para seleccionar luego una técnica lo bastante sensible como para permitir determinar cada una de ellas a distintos tiempos o en las diferentes porciones en las que han sido separadas. De este modo se distinguen entre los métodos de especiación, la especiación directa y las técnicas convencionales de extracción (combinados o mixtos).*

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1.3.1 Métodos de especiación Directa

Este grupo de técnicas incluye aquellas que proporcionan información completa sobre las especies de un elemento en una muestra dada sin necesidad de un proceso de extracción o separación. Sin embargo, pocas técnicas instrumentales poseen la sensibilidad y selectividad suficientes para llevar a cabo con éxito análisis de especiación en muestras medioambientales de manera directa, siendo capaces de diferenciar entre las distintas formas químicas de un elemento. A continuación se mencionan los métodos más destacados:

a) Determinación isotópica de un elemento. La composición isotópica de un elemento puede variar de forma natural debido a la radioactividad o al fraccionamiento cinético de las masas. La instrumentación para el análisis de los isótopos radioactivos requiere el uso de contadores de radiación beta, gamma o de centelleo. Para el análisis de los isótopos estables se emplean técnicas de espectrometría de masas, siendo entre todas ellas el ICP-MS la técnica preferida en la mayoría de los estudios [3].

b) Métodos electroquímicos.

Estos métodos se han aplicado para la cuantificación de distintos estados de oxidación de un elemento en disolución ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{4+}/\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}/\text{Ti}^{1+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}/\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}/\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Sb}^{5+}/\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{As}^{5+}/\text{As}^{3+}$  y  $\text{Se}^{6+}/\text{Se}^{4+}$ ), así como de sus especies organometálicas o de sus complejos metálicos en equilibrio [29, 30]. Existen dos grandes grupos de métodos electroquímicos para el reconocimiento/determinación de especies químicas:

1) métodos potenciométricos: donde la información analítica se obtiene a partir de una señal de potencial eléctrico que idealmente es proporcional (de forma logarítmica) a la actividad termodinámica (concentración) de la especie involucrada.

La potenciometría directa con electrodos selectivos, en principio, resulta muy adecuada para el análisis de especiación por su respuesta selectiva en condiciones adecuadas a los iones libres en disolución acuosa. Existen diferentes tipos de electrodos selectivos comerciales, que difieren entre sí respecto a sus rangos de trabajo, límites de detección, grados de error y posibles efectos interferentes. Estos electrodos selectivos pueden responder a la presencia de cationes (ej.:  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) y de aniones (ej.:



*F, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, S<sup>2-</sup> ). Además existen electrodos selectivos para gases (ej.: NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>), electrodos bioselectivos (basados en reacciones substrato-enzima) y electrodos biocatalíticos (en los que una capa de enzima o biocatalizador se inmoviliza en una superficie de un electrodo de vidrio selectivo para cationes a través de una membrana semipermeable). El límite de detección de la mayoría de los electrodos comerciales disponibles está dentro del rango de 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> [28,31], lo que limita su aplicación en el análisis de trazas.*

*También se pueden aplicar otros métodos electroquímicos, como la polarografía diferencial de impulsos, la cual es capaz de originar señales separadas para iones metálicos libres y las correspondientes formas metálicas complejas. De igual modo, la polarografía puede diferenciar entre estados de oxidación, por ejemplo Fe (III) y Fe (II), en virtud de sus respectivas ondas de reducción y oxidación con el mismo potencial de semionda [32].*

*2) método amperométrico y voltamperométricos: donde la información analítica se obtiene a partir de la medida de la corriente de respuesta bajo la aplicación de un potencial constante (amperometría) o de potencial variable (voltamperometría) con el tiempo. Quizás el procedimiento electroquímico más usado en los análisis de especiación sea la voltamperometría de redisolución anódica (ASV), sobre todo en el caso de los metales pesados tóxicos, y que, a niveles de trazas, puede determinar alrededor de 15 elementos, tanto su concentración total como especies lábiles complejadas, aunque éstas últimas en condiciones muy críticas [33]. Además, la técnica ASV no perturba la distribución de especies por lo que, al menos en teoría, puede identificar y cuantificar cada una de las especies en función de su potencial de reducción. La alta sensibilidad de esta técnica permite la detección de un número limitado de elementos traza a niveles de concentración frecuentes en la naturaleza (ej.: en agua de mar muchas especies de interés aparecen a concentraciones de 10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>). Esta técnica es especialmente útil para el control de elementos con un interés medioambiental, como por ejemplo Cu, Pb, Cd o Zn. En la práctica, se pueden definir categorías de especies que se determinan después de un pretratamiento sencillo de la muestra. Hay que tener en cuenta que la adición de ácidos fuertes y la digestión de la muestra transforman las especies químicas, por lo que se perderían las especies originales contenidas en la matriz a estudiar, haciendo solamente posible la determinación de la concentración total del metal [34].*

## 1. INTRODUCCIÓN

c) Espectroscopia. Son técnicas económicas y de fácil manejo. Sin embargo, solo en algunos casos permiten la determinación directa de formas específicas de un elemento (especiación redox), usándose la mayoría de las veces acopladas con alguna técnica de separación previa, tales como intercambio iónico, extracción con disolventes, etc. Las especies coloreadas oxianiónicas de manganeso y cromo pueden ser determinadas espectrofotométricamente, sin la necesidad de emplear ningún reactivo [35, 36].

Sin embargo, es habitual que se necesite el uso de un reactivo que forme un complejo específico coloreado (reactivos cromogénicos que reaccionan con el ion metálico libre, pero también con otras especies complejas del metal, en las que pueda desplazar el ligando natural por competición con el ligando añadido) [33]. Este sistema se ha empleado para determinar la presencia de iones Cu (I) en agua de mar, procedente del Golfo de Méjico y del Océano Atlántico [37]. Por otro lado, la fluorescencia se ha empleado, entre otras investigaciones, en estudios cinéticos de complejación de iones metálicos por ligandos coloidales, tanto en aguas como en suelos.

Las técnicas que utilizan la difracción o absorción de rayos X, como la medida de absorción de rayos X cerca al borde de absorción (del inglés, X-Ray Absorption Near Edge Spectroscopy, XANES), medida de absorción de rayos X en la región lejana al borde absorción (del inglés, Extend X-Ray Absorption Fine Structure, EXAFS), o la difracción de rayos X (del inglés, X-Ray Diffraction, XRD), permiten también la caracterización química en muestras sólidas de ciertos compuestos metálicos (ej.: de Zn, Hg, Pb, Fe, As). Mientras que algunas de estas técnicas proporcionan una alta resolución espacial para muestras sólidas, debido a su baja sensibilidad la cuantificación directa de ciertas especies puede resultar muy difícil sin una separación previa de las especies de interés [3].

Otras técnicas espectroscópicas que pueden emplearse en la especiación directa son la Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la Espectroscopia Mossbauer, la Espectroscopia de Infrarrojo, (IR) y la Espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico (ESR). La principal desventaja de estas técnicas es la baja sensibilidad o poca especificidad que presentan, siendo necesario la separación de los compuestos. De entre estas técnicas, la espectroscopia de RMN es especialmente útil para determinar las constantes de formación de los complejos metálicos [3].

### **1.1.3.2 Métodos de especiación convencionales de extracción**

*En sus inicios la especiación se realizaba en discontinuo, es decir primero se realizaba la etapa de separación de las especies químicas, empleando para ello procesos físico-químicos, que permiten obtener secuencialmente fracciones de las especies a determinar sin alterar el estado natural de éstas. Posteriormente, se aplicaban las técnicas de detección no acopladas entre las que destacan la Espectroscopia de Absorción Atómica (AAS), la Espectroscopia de Emisión con Plasma (ICP), Espectroscopia de Emisión con Plasma inducido por microondas (MIP-AFS) o Espectroscopia de Emisión con Plasma de corriente continua (DCP-AES) y la Fluorescencia Atómica (AFS).*

*En la actualidad está más extendido el uso de las técnicas acopladas principalmente debido al alto grado de automatización que ofrecen, además de una buena reproducibilidad y rapidez. Estos métodos constituyen la herramienta más común para la especiación de los elementos trazas. En ellos se combinan al menos dos técnicas analíticas, la primera es una técnica de separación que se emplea para separar las especies químicas que van a ser cuantificadas por la segunda técnica analítica, que suele poseer una elevada sensibilidad y que se conectan mediante una interface. Entre las desventajas de los sistemas combinados o híbridos se incluye el incremento de la complejidad y por tanto un mayor riesgo de que se produzcan cambios en el sistema a analizar. Así, pueden darse alteraciones de los equilibrios entre las especies durante la separación, debido a procesos como la dilución o la separación de las especies que forman parte de un equilibrio químico, pudiéndose provocar en último momento la transformación o incluso la destrucción de las especies químicas.*

*Como técnicas de separación las más comúnmente utilizadas son las cromatografías de gases (GC) o de líquidos (LC), la electroforesis capilar (CE). Como técnicas de detección las más utilizadas son las técnicas de espectroscopia atómica que una vez acopladas o hibridadas a las de separación son realmente muy sensibles y muy útiles en el campo de la especiación ya que se reduce el tiempo de análisis y por tanto las posibles transformaciones de las especies durante el mismo [7, 10, 38]. El acoplamiento de las técnicas cromatográficas de gases o de líquidos con las técnicas espectroscópicas atómicas ha tenido un amplio desarrollo en el campo de la especiación metálica durante las décadas de los ochenta y noventa [39-47].*

## 1. INTRODUCCIÓN

*Por lo general, la cromatografía líquida de alta resolución es una técnica adecuada para llevar a cabo estudios de especiación, habiéndose desarrollado métodos para la separación de muchas especies inorgánicas (catiónicas, aniónicas y complejas), pero sobre todo los relativos a especies organometálicas no volátiles. Los compuestos organometálicos volátiles pueden ser medidos directamente por GC con tal de que sean térmicamente estables. El acoplamiento de las estas técnicas con detectores específicos, como los basados en cualquier método de Espectroscopia Atómica tales como Absorción Atómica con llama (del inglés, flame atomic absorption spectroscopy, FAAS), Absorción Atómica con horno de grafito (del inglés, graphite furnace atomic absorption photometry, GF-AAS), Espectroscopia de Emisión Atómica con Plasma (del inglés, inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, ICP-AES) o la hibridación Plasma de Acoplamiento Inductivo-Espectrometría de Masas (del inglés inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS), es, actualmente, una potentísima herramienta para llevar a cabo este tipo de estudios [48].*

*Las técnicas de separación electroforéticas, basadas en la migración de iones dentro de un campo eléctrico, también son usadas en especiación metálica. La electroforesis capilar (CE) es un tipo de electroforesis de desarrollo reciente que utiliza el mismo tipo de capilares finos que se utilizan en la cromatografía de gases; el uso de estos capilares resuelve el problema de calentamiento ya que los flujos de corrientes son menores y el calor se disipa más fácilmente. En la electroforesis capilar ocurre además un proceso de separación adicional debido al flujo electro-osmótico. La pared interna del capilar está cargada negativamente como consecuencia de la presencia de grupos silanol y atrae a los iones positivos hasta formar una doble capa eléctrica, siendo la capa interna fija y la externa móvil. En el momento que se aplica un campo eléctrico, los cationes de la capa exterior serán atraídos hacia el cátodo; como los cationes se encuentran solvatados arrastran al resto de la disolución con ellos, a lo largo del capilar (flujo electro-osmótico) [38].*

*La electroforesis capilar se puede usar como técnica de separación primaria o secundaria (ej.: después de LC) en cuyo caso se clasifica como técnica bi-dimensional. Teniendo en cuenta la poca capacidad de carga de la CE, la técnica bi-dimensional aumenta el rendimiento de los resultados, llevando la alta resolución de la CE a su máximo potencial. Estos sistemas a menudo están acoplados con detectores de UV, lo que permite la obtención de la información molecular pero también se pueden acoplar con ICP-MS o electroespray espectroscopia de masas, (del inglés, electrospray-mass spectrometry, ESMS)*

*para adquirir información a nivel elemental o molecular. Existen diferentes modos de separación para la electroforesis capilar: la electroforesis capilar de zona (del inglés, capillar zone electrophoresis, CZE) con una separación basada en la relación carga/masa de las especies, la isoelectro-enfoque capilar (del inglés, capillary isoelectric focusing, CIEF) basada en el punto isoeléctrico, la isotacoforesis capilar (del inglés, capillary isotachopheresis, CITP) basado en la conductividad del analito y la cromatografía capilar electrocinética micelar (del inglés, micellar electrokinetic capillary, MEKC) basado en el carácter hidrófobo del analito. La técnica de electroforesis capilar ofrece una alta resolución así como una alta velocidad y se puede adaptar fácilmente para realizar análisis cuantitativo de forma automática. Gracias a ello, ha sido aplicada de manera satisfactoria a los análisis de especiación de muchos compuestos, como los compuestos de  $Cr^{3+}$  / $Cr^{6+}$ , compuestos de selenio (selenio en la leche humana) y arsénico, y metalotioneinas de los metales Cu, Cd y Zn [29, 30].*

#### **1.1.4 Carácter esencial y tóxico de los metales en alimentos**

*Es necesario conocer las especies químicas de los elementos para comprender las reacciones químicas y bioquímicas en las que intervienen, y por tanto, obtener información relativa al carácter esencial y tóxico de los elementos.*

*Los elementos, generalmente en función de su estado de oxidación y del medio, forman parte de distintas moléculas, por lo que los análisis de especiación se convertirán en una herramienta esencial para la evaluación de toxicidad.*

*Alrededor de los 50 elementos conocidos pueden ser medida su concentración en sistema vivo. En los humanos y otros mamíferos 23 elementos tiene actividades fisiológicas conocidas y de ese grupo 11 pueden ser clasificados como elementos traza, por su esencialidad y la pequeña cantidad requerida en los organismos vivos, los otros metales son considerados macronutriente, donde son requeridos en mayores cantidades. Los metales traza son esencialmente componentes de estructuras biológicas, pero al mismo tiempo al ser su concentración requerida tan mínima (alrededor de 100mg/día) pueden llegar a ser tóxico en concentraciones superiores a las necesarias para sus funciones biológicas. Entre estos elementos traza están: Va, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo, Se, I, F [49].*

## 1. INTRODUCCIÓN

### **1.1.4.1 Importancia de la especiación en alimentos**

*En el caso del jamón curado, no hay muchos estudios realizados propiamente de especiación. Sin embargo, varios autores se han centrado en dilucidar la formación del complejo responsable del color en este tipo de jamón, así como también su identificación en varios de estos productos curados que no llevan en su producción sales de nitritos y/o nitratos [50,51].*

*Por otro lado, la utilización de los moluscos bivalvos (como por ejemplo, ostras y mejillones) como bioindicadores medioambientales ha llevado a numerosos estudios de especiación que se centran en los metaloides tóxicos y metales pesados como el As, Hg y Cd [52].*

### **1.1.5 Estudio de la trazabilidad en alimentos**

#### **1.1.5.1 Definición de trazabilidad**

*La Organización Internacional para la Estandarización (ISO) define trazabilidad como la propiedad del resultado de una medida o del valor de un estándar donde éste pueda estar relacionado con referencias especificadas, usualmente estándares nacionales o internacionales, a través de una cadena continua de comparaciones todas con incertidumbres especificadas.*

*Según el Comité de Seguridad Alimentaria de la Asociación Española de codificación comercial (AECOC):*

*“Se entiende trazabilidad como el conjunto de aquellos procedimientos preestablecidos y autosuficientes que permiten conocer el histórico, la ubicación y la trayectoria de un producto o lote de productos a lo largo de la cadena de suministros en un momento dado, a través de unas herramientas determinadas.”*

*En forma general, la trazabilidad es un conjunto de acciones, medidas y procedimientos técnicos que permiten identificar y registrar cada producto desde su origen hasta el final de la cadena de comercialización. Así, la trazabilidad faculta rastrear la cadena de producción y otorga a los productores la posibilidad de colocar sus productos en mercados específicos más rentables, que exigen la certeza del origen y de las distintas etapas del proceso productivo. [51]*

### **1.1.5.2 Características de la trazabilidad**

*El procedimiento o sistema de trazabilidad que se adopte dentro de cada empresa deberá tener en cuenta [53]:*

- ❖ *La identificación del producto, es decir, un medio único, lo más sencillo posible, para identificar un producto o agrupación de productos.*
- ❖ *Los datos del producto, es decir: Las materias primas, partes constituyentes del producto o mercancías que entran en cada empresa.*
- ❖ *La manera en que fue manipulado, producido, transformado y presentado, en caso de existir tales procesos.*
- ❖ *Su procedencia y destino, así como las fechas de ambos (una etapa antes y una etapa después).*
- ❖ *Los controles de que ha sido objeto, en su caso, y sus resultados.*
- ❖ *La relación entre la identificación del producto y los datos sobre el mismo. El seguimiento del movimiento de un producto (trazabilidad) va ligado a información comercial y de procesos internos y autocontroles.*

### **1.1.5.3 Estudio de marcadores para la trazabilidad de productos cárnicos**

*Unos de los aspectos más útiles que se puede aplicar al conocimiento de la trazabilidad, es el hecho de la autenticación de los productos. Para los productos curados como el jamón Ibérico, es muy importante contar con factores que puedan identificar su autenticación geográfica y/o procesos específicos propios de su elaboración.*

*No son pocos los investigadores, que han tratado de explicar las propiedades del auténtico jamón Ibérico y la comparación de éste con otros jamones de diferentes orígenes.*

*Entre los estudios más relevante de este aspecto se encuentran:*

- ✓ *El estudio de la química de los pigmentos y su relación con los alimentos curados [54].*

## 1. INTRODUCCIÓN

- ✓ *La identificación de las masas moleculares, producto de la proteólisis a diferentes tiempos de curado, rangos que pueden ir de 4500 Dalton a 160 Dalton [55].*
- ✓ *El estudio realizado por Bañon y col. [55], haciendo relación de la proteólisis y sus sub-productos con la calidad sensorial del jamón curado.*
- ✓ *En esta misma línea, Ruiz y colaboradores asocian la ruptura de los aminoácidos durante el proceso de curado con la formación de compuestos volátiles tales como el 2 y 3 metilbutanol [56].*
- ✓ *Más adelante, se estudian las propiedades espectrales (UV-V) del jamón Italiano “prosciutto di Parma” revelando la presencia de un compuesto lipofílico, proveniente de la proteólisis característico de este tipo de jamón [57].*
- ✓ *En un estudio más exhaustivo, este compuesto lipofílico, mencionado anteriormente, es independiente de las coordinaciones de los complejos del hierro. Siendo un complejo de zinc, llamado protoporfirina de zinc IX (ZnPP), que posteriormente es identificada como el principal cromóforo del jamón curado italiano [58].*
- ✓ *Este estudio trasciende a los jamones Ibéricos, identificando también a la ZnPP como parte de su composición [59].*
- ✓ *Mediante la técnica de espectroscopia de fluorescencia, se estudió la formación de la ZnPP en la mitocondria del corazón del cerdo, resaltando la habilidad de estas células para formar un precursor de la ZnPP a partir de la proteólisis y la liberación del  $Fe^{+2}$  del anillo porfirínico de la mioglobina [60].*

*Siguiendo esta misma línea, en este trabajo de tesis se ha realizado un estudio sobre la clasificación de estos jamones ibéricos e italianos, mediante la técnica de HSI y se ha conseguido identificar, mediante la técnica XAS realizada en sincrotrón, algunos elementos que pueden ser utilizados como biomarcadores del tiempo de curado.*



#### **1.1.5.4 Estudio de la biodisponibilidad de metales en moluscos**

*El interés por el estudio de la contaminación por metales pesados en los ecosistemas acuáticos, se debe a la importancia de su elevada toxicidad, alta persistencia y rápida acumulación en los organismos vivos. Varios estudios, entre ellos el de Martínez y col., reseñan que la acumulación de estos metales en los niveles superiores de la cadena trófica puede ser un peligro para la salud humana [61].*

*El análisis de los metales en las aguas y sedimentos es el modo más directo para determinar el grado de contaminación en el medioambiente, pero no proporciona información de la influencia y posible toxicidad de este tipo de contaminación en los organismos y el ecosistema.*

*Por consiguiente, en estas últimas décadas se ha ampliado el estudio del contenido de metales pesados en los organismos vivos acuáticos. Entre los que se encuentran: algas, macrófitos, zooplancton, insectos, moluscos bivalvos, gastrópodos, peces y anfibios, entre otros [62].*

*Un gran número de estos estudios resaltan los moluscos bivalvos, debido a su gran poder de retención de metales pesados y a la posibilidad de encontrarlos en numerosos puntos de las zonas costeras, y porque representan una parte importante en la gastronomía de la población de un país. También permiten establecer el grado de perturbación de los ecosistemas, ya que estos metales pesados al incorporarse en sus tejidos blandos se enlazan a una gran variedad de moléculas orgánicas lo cual implica procesos complejos de incorporación [63].*

*El conocimiento biológico y cinético de estos organismos como biomonitores, es requisito esencial para su elección. La identificación de la especie, tamaño y/o edad es vital para darle solidez al estudio y trascender a comparaciones posteriores entre diferentes regiones geográficas [64].*

*Un estudio enfocado en la biodisponibilidad de metales pesados, en mejillones provenientes del estuario del Abra, concluye que el contenido de metal (g) por unidad de concha (g) en el mejillón es una herramienta confiable para evaluar la biodisponibilidad de los metales (calculada a partir de la expresión según Fischer 1984) [65]. Esta teoría se apoya en el hecho de que estos invertebrados acuáticos acumulan metales traza ya sean esenciales o*

## 1. INTRODUCCIÓN

no, y sus concentraciones posteriores en el cuerpo muestran una variabilidad entre los metales, proporcionando así una gran cantidad de información en cuanto a la geografía y variación en biodisponibilidades de los metales pesados [66]. Estas concentraciones se interpretan en términos de diferentes patrones de acumulación, dividiendo los metales acumulados en dos:

Especies metálicas-metabólicamente disponible: por ejemplo material particulado ( $>0,45 \mu\text{m}$ ), coloidal ( $1 \text{ nm}-0,45 \mu\text{m}$ ) y especies disueltas ( $\leq 1 \text{ nm}$ ). En estas últimas especies se incluyen los iones metálicos hidratados, los cuales suelen ser considerados como la fracción metálica más biodisponible, así como los complejos metálicos orgánicos e inorgánicos con ligandos de origen natural o antropogénico, los cuales son potencialmente biodisponibles

Metal almacenado: específicamente en la relación de las tasas de captación/excreción y desintoxicación del metal, la cual determina la aparición de efectos tóxicos en los organismos expuestos.

Este enfoque puede ser usado para predecir las tasas y rutas de bioacumulación de metales y ayudar a interpretar las concentraciones acumuladas [67]. Estudios más recientes sobre los diferentes patrones de acumulación, indican que las respuestas fisiológicas / bioquímicas y geoquímica frente a los metales, son las responsables de las diferencias en las concentraciones de metales observadas en diferentes poblaciones de especies acuáticas [68].

El análisis de las dos especies más abundantes de moluscos bivalvos (*Donax trunculus* y *Chamelea gallina*) a lo largo de la costa atlántica del sur de España, arrojaron gran variabilidad de las concentraciones de metales traza, no solo en las dos especies sino también entre sus tejidos [69].

### 1.2 Técnicas analíticas

El objetivo de este apartado es de describir las herramientas básicas necesarias para la comprensión de las metodologías analíticas utilizadas en el presente estudio, incluyendo el procesamiento de datos e interpretación de los mismos, así como también el procedimiento

*de normalizado operacional que facilita la aplicación de la metodología analítica en cada caso. Posteriormente en otro apartado se ha desarrollado la aplicación de estas técnicas en nuestros biomateriales objeto de estudio.*

*La descripción que se presenta es sólo indicativa de forma que el lector pueda comprender el empleo de estas técnicas y sus resultados, cualquiera que sea su especialización. No obstante, en la exposición, se introducen referencias específicas con el objetivo de ampliar con más detalle algunos de los temas tratados, ayudando así al lector interesado que desee profundizar o simplemente ampliar la información proporcionada.*

### ***1.2.1 Introducción al concepto de Imagen Hiperespectral (del inglés, hyperspectral image, HSI)***

*La disponibilidad de información digital acerca de la superficie terrestre, obtenida de forma remota a partir de satélites o plataformas aerotransportadas, ha supuesto una auténtica revolución en nuestra concepción actual del mundo. Esta observación remota de la tierra constituye el marco de estudio de lo que se llama en inglés “remote sensing”, que surgió a principios de los años 50 para designar cualquier medio de observación remota, que se aplicó en un principio a la fotografía aérea, principalmente el sensor de aquel momento [70].*

*No obstante, el desarrollo del computador digital permitió optimizar los mecanismos de almacenamiento, procesamiento y transmisión de los datos proporcionados por dispositivos remotos, el desarrollo de las técnicas de reconocimiento de patrones, propiciado en parte por la creciente capacidad de las computadoras digitales, ha supuesto que, en la actualidad, la extracción de información significativa y relevante a partir de los datos de observación remota sea una tarea simple y cada vez más automatizada [71].*

*Históricamente, las técnicas de análisis de datos obtenidos de forma remota han seguido una serie de etapas marcadas por la evolución de los instrumentos de observación remota. En etapas tempranas, estos medios se caracterizaban por estar montados sobre plataformas exclusivamente espaciales, por lo que las técnicas de análisis derivadas se basaron en enfoques fundamentalmente espaciales. Posteriormente, la disponibilidad de instrumentos capaces de medir singularidades en el espectro de la luz reflejada por los diferentes materiales presentes en el mundo real trajo como consecuencia la introducción de las técnicas basadas en espectroscopia. En la actualidad, existen instrumentos que*

## 1. INTRODUCCIÓN

permiten un enfoque integrado en lo que se considera tanto la información espacial como la espectral [72]. En este sentido, es muy importante destacar que la integración de ambas fuentes de información constituye en la actualidad uno de los mayores desafíos a la hora de desarrollar nuevas técnicas de análisis de este tipo de datos, ya que la mayor parte de las aproximaciones clásicas publicadas se centran en la utilización de la información espectral y prestan menos atención a la correlación espacial de los datos, la cual puede proporcionar informaciones únicas en la caracterización de muestras.

### 1.2.1.1 Fundamentos de la técnica

HSI es una técnica no destructiva que proporciona información espectral espacial precisa y detallada de una muestra. Se basa en la construcción de imágenes espectrales, construidas por medio de la integración de un hardware y software capaz de manejar espectros, con una secuencia de imágenes con alineación predefinida a un nivel de energía. La técnica consiste en capturar una imagen con la cámara instalada en el equipo y obtener para cada píxel de la imagen un espectro en un rango determinado de longitudes de onda. La información espectral y espacial que se obtiene al mismo tiempo, desde el objeto investigado, están dispuestas en un “hipercubo” Figura 1, que es un conjunto de datos 3D caracterizado por dos dimensiones espaciales y una dimensión espectral [72,73], teniendo en cuenta que en una imagen hiperespectral el espectro de cada píxel puede ser analizado. De acuerdo con la diferente longitud de onda de la fuente y la sensibilidad espectral del dispositivo, se pueden analizar varias características físico-químicas de una muestra [73]. En estos últimos años HSI representa una solución atractiva para la caracterización, clasificación y control de calidad de materiales diferentes en varios sectores industriales. Se ha empleado en la inspección de alimentos [74,75], en la detección de contaminantes en los productos agroalimentarios por ejemplo de carne y hueso en relación a la crisis de la EEB (Encefalopatía espongiforme bovina) [76,77], en el sector farmacéutico [78, 79] en la medicina [80, 81] en obras de arte [82] y en estudios de polímeros [83]. También, se ha empleado esta técnica en los sectores de residuos sólidos, como por ejemplo; el reciclado de vidrio [84] la caracterización de pelusa [85], las cenizas restantes en los incineradores de los desechos sólidos municipales [86], el control de calidad en los productos de compost [87], y en la clasificación de poliolefinas [88, 89]. En el marco del control de calidad de los cereales,

especialmente de maíz y trigo, diferentes aplicaciones de HSI se han reportado en la literatura que implican, por ejemplo, la evaluación de la contaminación fúngica [90, 91], la detección de daños inducidos por insectos [92], o la determinación de la dureza de los granos [93].

Los estudios realizados en la aplicación de técnicas de HSI para la clasificación e inspección de materiales están aumentando cada día, lo que demuestra que esta técnica es una herramienta analítica muy adecuada y prometedora para el control de calidad. A pesar de estas ventajas, HSI es aún difícil de ser aplicado de forma sistemática, especialmente en aplicaciones industriales en tiempo real, debido a la enorme cantidad de datos contenidos en imágenes espectrales, lo que requiere tiempo de cálculo, demasiado tiempo de comparación, especialmente cuando se trata con partículas que se mueven en la cinta transportadora para ser reconocidas y/o seleccionadas con alta velocidad de procesamiento. Una forma de superar este problema es identificando unas pocas longitudes de onda más útiles, reduciendo de este modo la adquisición y el tiempo de análisis de datos [94].

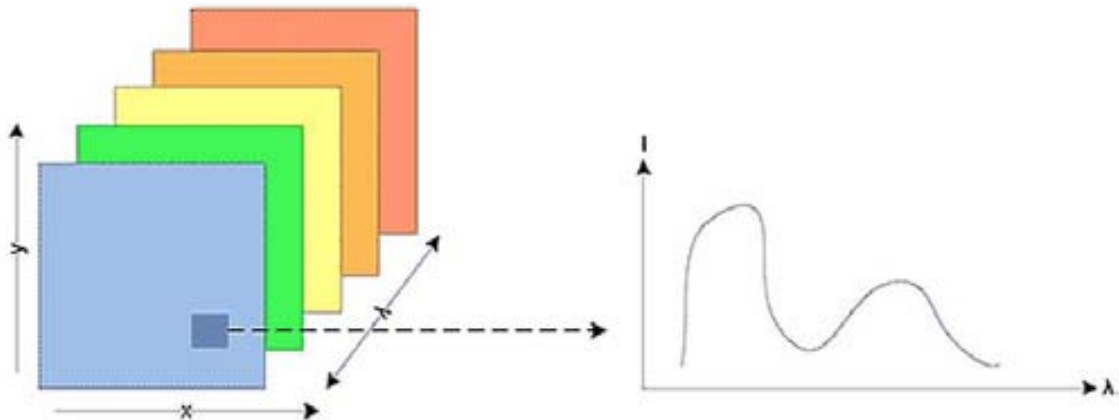


Figura 1. Representación del "hipercubo". Cada imagen representa una banda particular a una determinada longitud de onda y cada píxel consiste en un espectro de una región espectral [95].

## 1. INTRODUCCIÓN

Los equipos empleados para el estudio de imágenes hiperespectrales pueden variar en cuanto a su configuración de acuerdo a las necesidades específicas de cada laboratorio. Sin embargo, se pueden definir las siguiente partes fundamentales [74, 96] (figura 2):

- Sistema de transporte de muestras. El sistema cuenta con una cinta transportadora controlado por un software. El detector es capaz de registrar dos dimensiones del cubo hiperspectral a la vez; una espacial y una espectral. Obteniendo un espectro de cada píxel de la muestra.
- Fuente de iluminación. La muestra es iluminada con una lámpara halógena de 150W, posicionada con una inclinación de 45° respecto al plano de la muestra.
- Espectrofotómetro (Acoplado al equipo)
- Cámara. El acoplamiento entre el espectrofotómetro y de la cámara hace que las medidas realizadas en las longitudes de onda de los extremos no sean bien registradas y se han de eliminar en el análisis. Esta configuración del sistema permite un tiempo de análisis muy reducido y la posibilidad de medir diversas muestras simultáneamente, siempre que el campo registrado por el objetivo sea suficiente.

La resolución de las imágenes obtenidas está fijada al eje de abscisas (el número de píxeles del detector), mientras que el eje de ordenada depende de la velocidad con que avanza la cinta transportadora de muestras. A más velocidad de la cinta, el área medida en cada píxel es más grande, haciendo que la imagen obtenida pierda definición.

- Los valores de reflectancia siguen la Ecuación A

$$R = \frac{r_s - r_b}{r_w - r_b} \text{ Ecuación A (97, 98)}$$

Donde  $r_s$  es el valor de reflectancia medida directamente,  $r_b$  es la reflectancia medida por el negro (correspondiente al ruido de fondo) y  $r_w$  es el valor de reflectancia medida por una muestra estándar blanca. Los valores de  $r_b$  y  $r_w$  se obtienen con el calibrado del equipo.

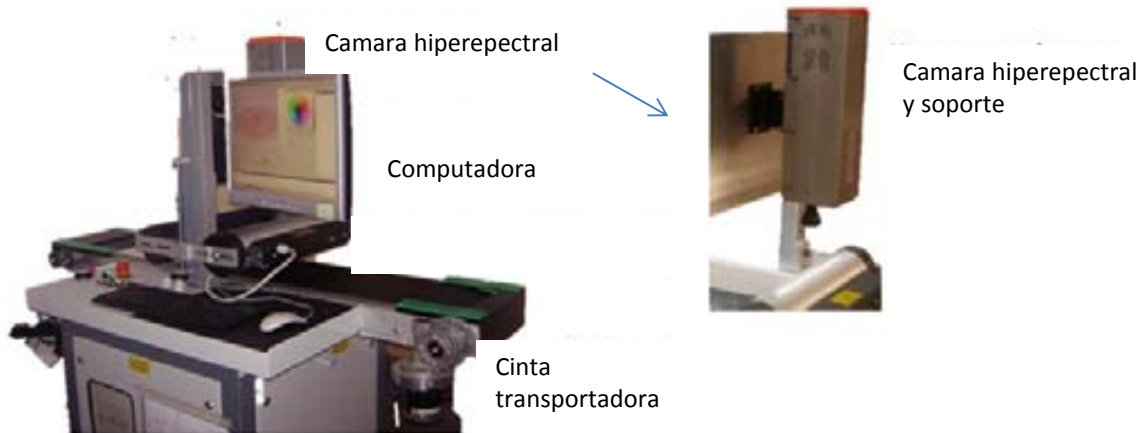


Figura 2. Representación de los principales componentes del equipo HSI utilizado para la adquisición de imágenes espectrales (HSI).

#### 1.2.1.2 Concepto básico de imágenes hiperespectrales

Una definición común de imágenes hiperespectrales es: “La adquisición simultánea de imágenes espaciales en muchas bandas espectrales contiguas medidas a partir de una plataforma de operación remota” [99]. La naturaleza combinada de las imágenes y la espectroscopia, representadas en una imagen hiperespectral, proporcionan simultáneamente las características físicas y geométricas (forma, tamaño, apariencia y color de la muestra bajo análisis, así como la composición química de la misma a través del análisis espectral [100].

Hay tres enfoques distintos para construir imágenes hiperespectrales basadas en el método por el cual se adquiere la información espacial, ellos pueden ser:

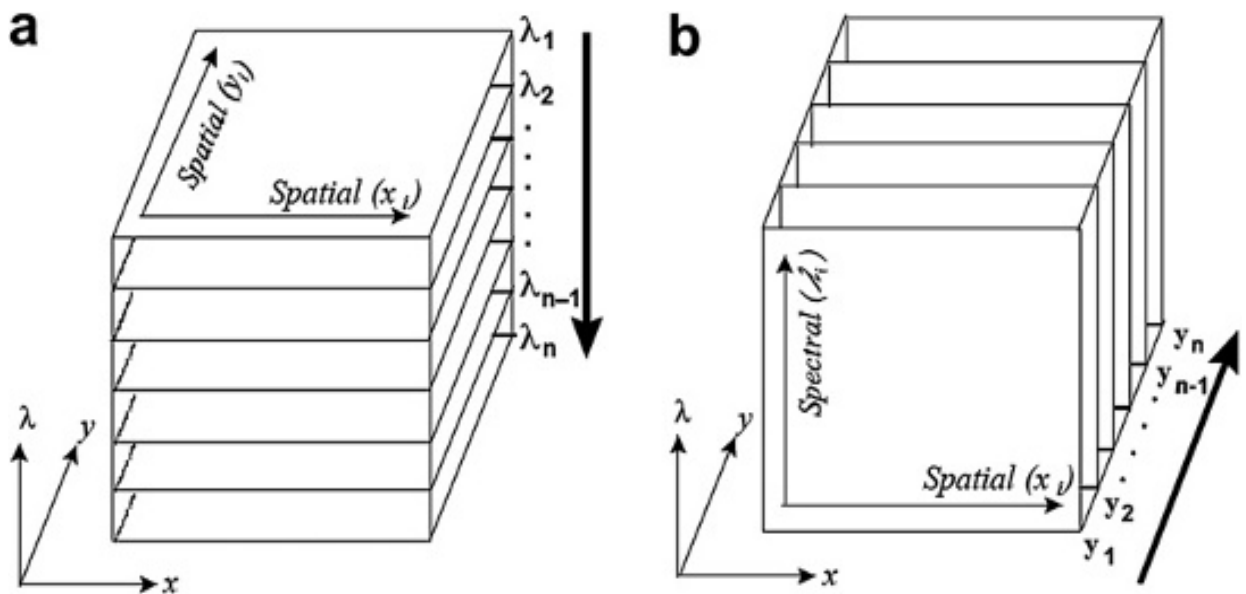
- Whiskbroom (plumero) que va haciendo exploración por punto.
- Pushbroom (cepillo) que va haciendo exploración por banda.
- Filtros sintonizables, conocido también como explorador por área.

## 1. INTRODUCCIÓN

Una representación gráfica de la generación de imágenes hiperespectrales viene dada en la Figura 3, donde las flechas indican las direcciones de la adquisición secuencial de la información o datos para completar el cubo de información espacial y espectral “Hiper-cubo”. Como se observa hay dos modos:

(a) Modo de escaneo a través de la longitud de onda, explorador por banda o de Filtro sintonizable.

(b) Modo de escaneo espacial o Imagen pushbroom: La imagen es adquirida línea por línea a lo largo del eje de ordenadas. Este método es el que hemos utilizado en la adquisición de nuestras imágenes [101].



**Figura 3.** Representaciones conceptuales de los modos de adquisición de imagen [75].



### 1.2.1.3 Adquisición de la imagen hiperespectral

La formación de imágenes hiperespectrales se suele llevar a cabo de dos maneras: de modo reflectancia y de modo de transmitancia, dependiendo de la disposición relativa entre la fuente de luz y la unidad óptica (lente, espectrofotómetro y cámara) [102]. La adquisición de nuestras imágenes fue en forma de reflectancia, que luego fue transformada como absorbancia aparente.

#### Selección de regiones de interés

El software asociado al sistema, permite seleccionar zonas aleatoriamente, según el interés del analista, a estas zonas se le llama, regiones de interés (ROI) sobre la superficie medida, siendo el promedio de la reflectancia por pixeles de toda el área seleccionada dando como resultado un solo valor [103]. Ver figura 4.

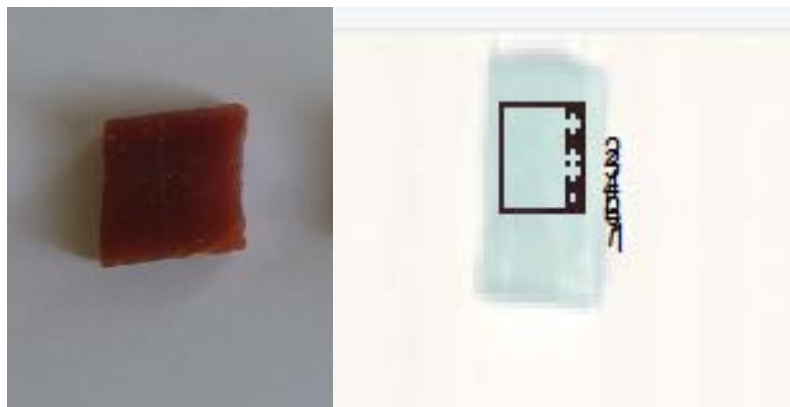


Figura 4. Imagen de un trozo de jamón y ejemplo de la selección de una ROIs sobre la superficie de una imagen reconstruida.

### 1.2.1.4 Corrección de la imagen hiperespectral

La gran cantidad de información en numerosas bandas continuas hace de las imágenes hiperespectrales sean una herramienta útil para el análisis y caracterización que la industria agroalimentaria necesita. Por lo tanto, es necesario un proceso de calibración robusto para garantizar la fiabilidad de la información extraída. En primera instancia el eje espectral debe ser calibrado usando iluminantes estándar de emisión de luz. Una segunda calibración se da en el proceso de adquisición de imágenes hiperespectrales, éstas necesitan una

## 1. INTRODUCCIÓN

*calibración posterior de la reflectancia, la cual debe ser corregida de la respuesta espectral de la muestra y de la cámara térmicamente sensible [104].*

*Una vez recibida la imagen en la memoria del sistema, ésta se procesa, esto significa que la imagen se segmenta píxel a píxel, se filtra el resultado obtenido de la imagen y se extrae la información necesaria de cada uno de ellos. Todos estos algoritmos, comúnmente son llamados cadena de procesamiento, que abarca desde la adquisición de la imagen hasta su análisis, por lo regular estas correcciones, se hace antes de transferir los datos para su pre-procesamiento.*

*Para optimizar el proceso se pueden descartar regiones en la imagen que no es necesario analizar y seleccionar las ROI, descritas anteriormente.*

### **1.2.1.5 Pre-procesamiento de la imagen hiperespectral**

*El uso de diferentes técnicas de pre-procesamiento para corregir los efectos no deseados consiste en tratar matemáticamente los datos espectrales, tales como la dispersión de la luz, las variaciones de longitud de onda y el ruido aleatorio resultante de la determinación de las propiedades físicas (efectos instrumentales) de la muestra.*

*Este paso se realiza antes de la modelización multivariante a fin de reducir, eliminar o normalizar dicho impacto en los espectros y por ende mejorar significativamente la robustez del modelo de calibración.*

*El hecho de utilizar técnicas de pre-procesado de imágenes hiperespectrales orientadas a la reducción de la dimensionalidad de los datos de entrada viene propiciado, entre otros motivos, por el conocido como fenómeno de Hughes [105], descrito a continuación. En un problema de clasificación típico, el objetivo es asignar una etiqueta de clase a los datos de entrada. El error mínimo esperado que se puede alcanzar al realizar la clasificación es lo que se conoce como el error de Bayes [105]. El error de Bayes es una función que decrece con la dimensionalidad de los datos. Una nueva característica añade información sobre el ejemplo y entonces, uno esperaría que la clasificación fuese tan buena como cuando esta información no se había introducido. Sin embargo, en la práctica esto no es así, cuando se añade una nueva característica a los datos el error de Bayes disminuye, pero al mismo tiempo las desviaciones del error de la clasificación aumentan. Este incremento se debe al*

hecho de que se necesitan calcular más parámetros partiendo del mismo número de ejemplos. Si el incremento de las desviaciones del error en la clasificación es mayor que el decremento del error de Bayes, entonces el uso de la característica adicional degrada la regla de decisión. Y este fenómeno es lo que se conoce como el efecto Hughes [103].

Es importante mencionar que existen muchos enfoques de pre-procesamiento descritos en la literatura científica [103] tales como, el suavizado espectral, uso de la función derivada, la normalización vectorial (del inglés *standard normal variate*, SNV), entre otros. La elección de las técnicas de pre-procesamiento depende fundamentalmente de la calidad de los datos espectrales en bruto, de las características principales a extraer, así como del uso de la información espectral extraída y del análisis de los mismos. La segmentación de la imagen podría considerarse como un paso del pre-procesamiento.

En el caso de este estudio, se ha aplicado el algoritmo de pre-tratamiento SNV y mean center, debido a que son los algoritmos que más se adecuan a los espectros obtenidos.

**Algoritmo SNV** o normalización Vectorial es uno de los métodos más utilizados para reducir efectos de dispersión en los espectros. La SNV centra y escala cada espectro de forma individual para hacer que cada uno tenga una mediana igual a cero y la desviación estándar igual a 1 [106]. La Figura 5, muestra los espectros antes (A) y después del tratamiento de SNV (B) notándose un ligero cambio al remover algunas dispersiones.

## 1. INTRODUCCIÓN

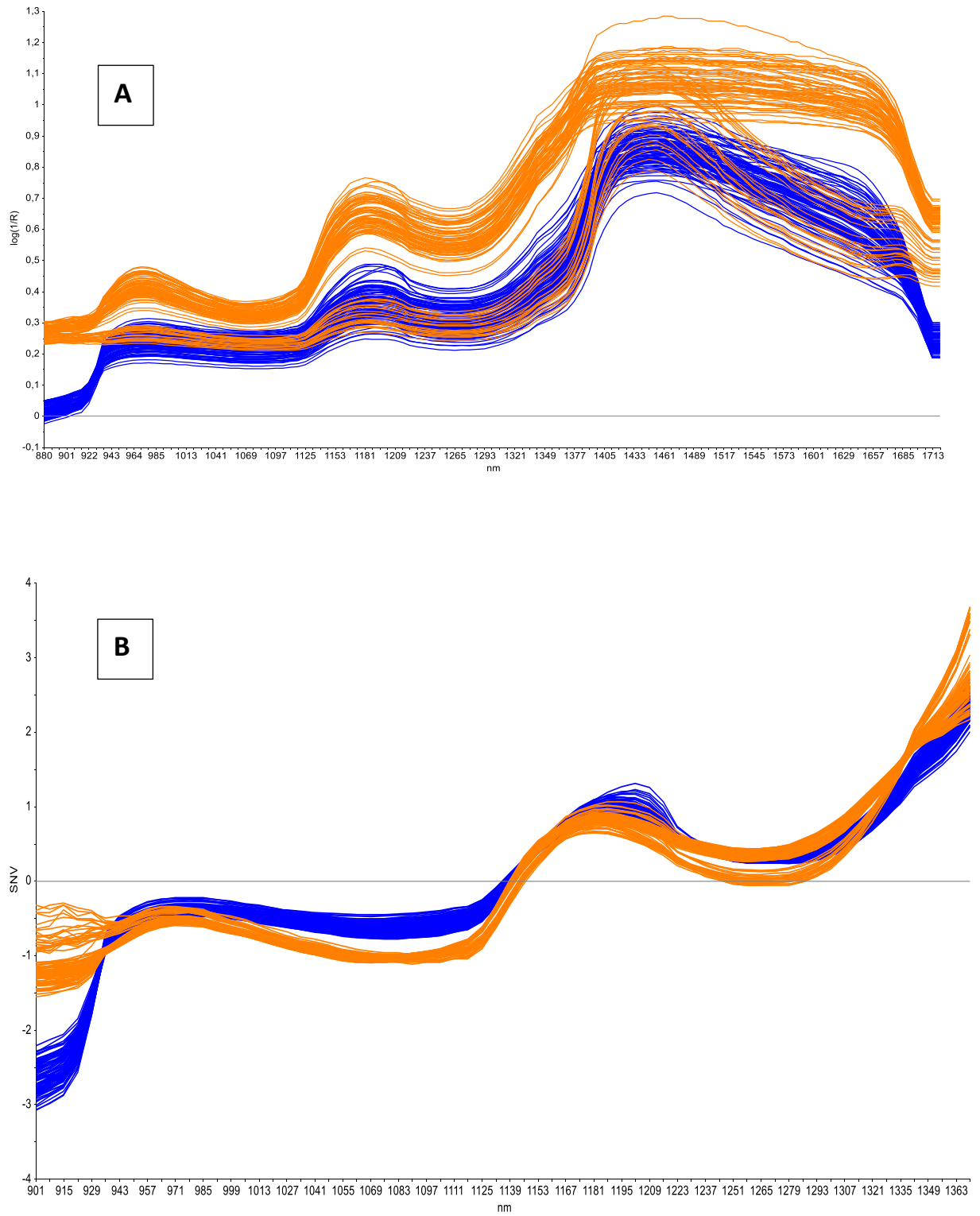


Figura 5. Espectros sin ningún tratamiento (A), y después de aplicar el tratamiento SNV (B).

**Mean center** (MnCn) se refiere a que las columnas centrales tengan media cero. Puesto que los datos multivariante se manejan normalmente en formato de tabla o matriz, donde las columnas son las variables, mean center implica la resta de los promedios variables de los datos es decir, calcula el valor promedio de cada variable y luego lo resta a los datos. Esto implica que cada columna será transformada de tal manera que la variable resultante tendrá una media de cero, y por consiguiente centra la columna [106].

#### **1.2.1.6 Procesamiento de la imagen (Tratamiento de los datos)**

Después de haber realizado el pre-procesamiento, nuestra imagen está lista para extraerle información relevante e incluso hace posible observar la variación de las propiedades de las muestras en estudio en todas las regiones de interés. Además, cada píxel de la imagen se transforma de manera significativa en imágenes donde se pueden apreciar sus propiedades químicas, visualizándose la distribución espacial cuantitativa de los componentes en función de sus concentraciones relativas. Esta es una de las ventajas más interesante de las imágenes hiperespectrales, la riqueza de los datos que residen en ellas; por lo que es necesario usar herramientas estadísticas y matemáticas para su análisis. La enorme cantidad de datos, sin duda, necesita de la combinación de análisis multivariantes y herramientas de visualización para extraer información significativa de manera eficiente. Usando el análisis multivariante se pueden clasificar los datos espectrales mediante técnicas (supervisadas o no-supervisadas) y analizarlos usando regresión multivariante (lineal o múltiple) [107].

Estos métodos permiten relacionar información física contenida en las imágenes espectrales con un conjunto de datos multivariante con variables químicas. Los métodos multivariantes de clasificación de datos hiperespectrales son numerosos.

#### **1.2.1.7 Herramienta de visualización**

La forma más simple de abordar los datos de una imagen hiperespectral es haciendo una clasificación de píxeles de la imagen hiperespectral que consiste en considerar que los píxeles de interés están compuestos por un solo material, utilizando las técnicas convencionales de clasificación de patrones [108] pero con mayor precisión, debido al elevado número de bandas espectrales disponibles.

## 1. INTRODUCCIÓN

Existe un conjunto de técnicas y algoritmos de clasificación de imágenes que realizan la interpretación de la misma, en base a la asignación de una etiqueta o clasificación individual a cada uno de los píxeles de la imagen.

En este caso se usó algoritmos de clasificación, los cuales pueden dividirse en dos grandes categorías [109]: algoritmos supervisados y algoritmos no-supervisados:

Algoritmos no-supervisados: Presuponen que no existe ningún tipo de conocimiento a priori sobre las clases existentes. El objetivo de estas técnicas es identificar, de forma automatizada, clases o agrupaciones de píxeles, utilizando para ello una métrica de similitud.

Algoritmos supervisados: Parten de un cierto conocimiento sobre las clases existentes, a partir del cual pueden derivarse criterios de clasificación. Esta aproximación suele venir dada por un paso previo en el que se seleccionan firmas espectrales características de las clases existentes.

Los algoritmos utilizados en este trabajo fueron los no-supervisados, por lo cual hablaremos con más detalle a continuación.

### 1.2.1.7.1 Algoritmos de clasificación no-supervisados (IsoData)

Las técnicas de clasificación de píxeles de forma no-supervisada en imágenes hiperespectrales se encuentran en plena fase de desarrollo [73]. Entre las técnicas existentes, destaca el método K-Means [110], que supone la existencia de K clases (parámetro que debe ser determinado a priori) y realiza una agrupación de los píxeles de la imagen en dichas clases utilizando vectores basados en los espectros promedio de dichas clases.

Por otra parte, el método ISODATA [111] también requiere la inicialización de un parámetro K relativo al número de clases deseadas, de forma previa a la ejecución del algoritmo. Además, este método necesita información relativa al número mínimo de firmas pertenecientes a una clase. Si el valor inicial de K es bajo, la dispersión entre clases diferentes puede ser muy alta. Por el contrario, si el valor inicial de K es alto, la distancia entre clases puede ser muy pequeña, provocando el particionamiento de una misma clase en varias clases similares entre sí. En general, la literatura reciente demuestra que los resultados obtenidos por estas dos técnicas no han sido demasiado satisfactorios, salvo en

aplicaciones muy concretas [112]. La clasificación *IsoData* no supervisada, clasifica las clases distribuyéndolas uniformemente en el espacio de datos para luego agrupar de forma interactiva los píxeles, utilizando técnicas de distancia mínima. Cada interacción recalcula el promedio de los píxeles y los reclasifica con respecto a los nuevos promedios. Cada división interactiva, clase, fusión y eliminación se realiza sobre la base de los parámetros del umbral de entrada. Todos los píxeles se clasifican a la clase más cercana (al menos que se especifique un umbral de desviación o la distancia estándar, en cuyo caso algunos píxeles son clasificados con los criterios seleccionados). El proceso finaliza cuando se alcanza el número de píxeles en cada una de las clases o el umbral de cambio de píxel seleccionado o número máximo de interacciones. La Figura 6 muestra un ejemplo de esta herramienta de visualización.

Para nuestro estudio el número de interacciones fue de 100 para cada imagen a tratar.



Figura 6. Imagen de un jamón Italiano reconstruida con los canales de las principales longitudes de onda (A) y luego clasificada con el método no supervisado *IsoData* del programa ENVI 5.0 (B)

#### **1.2.1.7.2 Algoritmo de clasificación supervisada**

Dentro de las técnicas de clasificación supervisadas, destacamos los filtros de similaridad (del inglés, *matched filters*) y el método SAM (del inglés, *Spectral Angle Mapper*), ambos basados en estadísticas de primer orden [113]. Dentro de esta categoría también pueden encontrarse otros clasificadores como las técnicas vecino más cercano (del inglés, *nearest neighbour*), distancia mínima (del inglés, *minimun distance*), ML, máxima probabilidad (del inglés, *parallelepiped* o *maximum likelihood*).

Una vez realizada la técnica de clasificación, se concluye evaluando el resultado obtenido de la aplicación del algoritmo *IsoData*, con las coincidencias entre las clases espectrales

## 1. INTRODUCCIÓN

obtenidas y la absorbancia de la imagen a diferentes longitudes de onda, para ello el área de la muestra de menor absorbancia se le asigna el color verde de la clasificación, y el color rojo corresponde al área de la muestra de mayor absorbancia.

### 1.2.2 Radiación de sincrotrón

La radiación del sincrotrón incluye un amplio rango de energías o longitudes de onda que abarca desde el infrarrojo hasta los rayos X.

La radiación del sincrotrón se caracteriza por ser:

- *Brillante.* Esta propiedad se refiere a la capacidad de localizar la radiación en un área muy pequeña y, por consiguiente, obtener una alta intensidad, siendo la radiación de sincrotrón un millón de veces más brillante que la que proviene de las fuentes convencionales de rayos X.
- *Polarizable.* La luz es una onda electromagnética, o sea un campo magnético que oscila con el tiempo y que se propaga. Esta oscilación es siempre perpendicular a la dirección de propagación.

Ahora bien, la oscilación se puede producir siguiendo:

- \* una recta: polarización lineal
  - \* una circunferencia: polarización circular
  - \* una elipse: polarización elíptica.
- *Sintonizable.* Esta propiedad permite escoger, de un conjunto de valores de la longitud de onda, la que más se adapte a las necesidades requeridas [114].

Una instalación de radiación de sincrotrón está compuesta de diferentes dispositivos principales comunes tal como se puede observar en la figura 7 [115].

- *Fuente de partículas en nuestro caso acelerador de electrones:* Donde se aceleran los electrones en un tramo recto. De 0 a 100 MeV
- *Anillo de aceleración:* Es el segundo anillo de aceleración para los electrones. Esta vez de 100 MeV hasta 3 000 MeV (3GeV)



- *Anillo de almacenamiento: Tiene por función reponer la energía del haz que se perdió por la emisión de radiación, permitiendo que este se mantenga constante por varias horas o días.*
- *Elementos magnéticos: Dipolos, son imanes curvadores “bending magnets” para curvar la trayectoria del haz de partículas (no se muestra en la figura porque son internos en el anillo de aceleración).*
- *Líneas de luz de sincrotrón: compuesta de la cabina óptica y cabina experimental, es donde se inserta la luz del sincrotrón mediante unos dispositivos especiales y aprovechados en mediciones experimentales.*



Figura 7. Esquema general de un sincrotrón y sus principales componentes [115].

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.2.2.1 Fundamentos teóricos de la radiación sincrotrón

#### Espectro y energía cinética del fotón

La radiación de sincrotrón abarca una amplia gama de energías de los fotones que van generalmente desde el infrarrojo hasta los rayos X duros. Aun cuando la radiación se emita continuamente en una órbita circular, para un observador a una distancia fija de la fuente de luz, ésta se muestra como una serie de pulsos equidistantes, como puede verse en la figura 8, donde se muestra un electrón en una órbita circular. En este caso la partícula está girando en un anillo de radio ( $\rho$ ), haciendo que la radiación emitida tome la configuración espacial de una espiral con una distancia  $L_0$  igual a  $2\pi\rho$  entre vueltas. Desde un punto fijo (punto A), verá pulsos de luz con una frecuencia  $c/L_0$ , donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío.

Como la amplitud angular del haz es del orden de  $1/\gamma$ , mientras ilumina al observador, la partícula viajara sólo una distancia ( $d$ ) de orden:

$$d = \frac{\rho}{\gamma} \quad \text{Ecuación B}$$

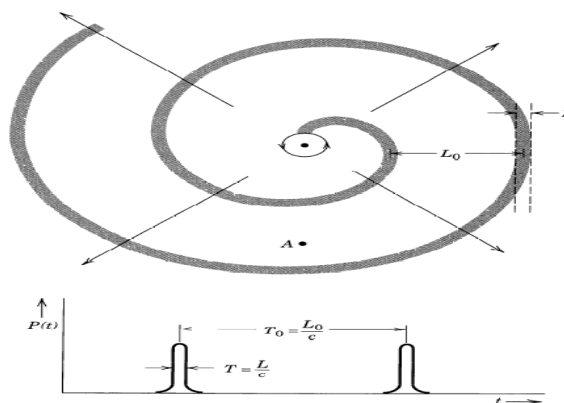


Figura 8. Una partícula en movimiento periódico emite un diagrama de radiación de forma espiral que un observador en el punto A detecta como pequeños pulsos de radiación de duración  $T=L/c$ , y que se suceden a intervalos regulares  $L_0/c$  [116].

### **1.2.2.2 Espectroscopia de absorción de rayos X (XAS)**

*Este trabajo se centra principalmente en la espectroscopia de absorción de rayos X (del inglés, X-ray Absorption Spectroscopy, XAS) una técnica analítica muy utilizada en diversas aplicaciones [117], la cual se ha utilizado para la especiación de los metales hierro y zinc en el jamón curado y arsénico y zinc en los moluscos.*

#### Medidas experimentales XAS

*En la espectroscopia de absorción de rayos X, comprende dos técnicas: XANES y EXAFS, que conllevan principios físicos y tratamientos matemáticos distintos, además de darnos diferentes informaciones.*

*La región XANES (del inglés, X-ray Absorption Near Edge Structure): está comprendida entre -30eV (electron-voltios) hasta la región de unos 50 eV por encima del borde de absorción, sobre esta región suele haber variaciones intensas de la absorción. El espectro XANES trabaja en la región donde la longitud de onda del fotoelectrón es del orden de las distancias interatómicas y, por ello, su camino libre medio es lo suficientemente largo como para que le ocurran dispersiones múltiples antes de que regrese al átomo central. De este modo, el espectro XANES involucra dispersiones múltiples y transiciones a estados desocupados, siendo rico en informaciones cristaloquímicas del átomo absorbente, como el estado de oxidación, la densidad de estados desocupados y la estructura cristalina en que está inmerso el átomo absorbente [118, 119].*

*Región EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure): Se llama así a la absorción en energía que ocurre en la región entre 50 hasta unos 1000 eV por encima del borde de absorción y que presenta oscilaciones más suaves en la absorción (estructura fina) y hoy en día se explica en términos de una teoría de múltiple scattering.*

*Esta estructura fina posee información precisa sobre la estructura atómica local alrededor del átomo absorbente. En esta región, el camino libre medio del fotoelectrón es corto y las dispersiones múltiples se vuelven menos probables. Esto hace que las contribuciones más importantes al espectro EXAFS generalmente involucren sólo dos átomos, un absorbente y un retrodispersador, dando lugar a la dispersión simple. Sin embargo en ciertos casos los*

## 1. INTRODUCCIÓN

*camino de dispersión múltiple pueden tener contribuciones relevantes como para ser tenidas en cuenta en el análisis de los espectros [120].*

*Un espectro de absorción de rayos X nos da información respecto de las transiciones electrónicas en los niveles internos de un átomo, siendo el proceso básico la excitación de los electrones localizados en niveles 1s o 2p a través de la absorción de rayos X.*

*En la Figura 9 puede verse un espectro de absorción de rayos X. Al graficar el coeficiente de absorción en función de la energía, los datos experimentales muestran tres características generales:*

*(a) un decrecimiento general de la absorción de rayos X al aumentar la energía incidente  $E$ , lo que está de acuerdo con cálculos semi-clásicos simples que predicen un comportamiento del tipo  $\mu(E) \sim \rho Z/AE^3$  (donde  $\rho$  es la densidad de la muestra,  $Z$  y  $A$  el número y la masa atómica, respectivamente),*

*(b) la presencia de un aumento abrupto de la absorción a determinada energía denominada borde de absorción (K-edge), es única para un determinado átomo absorbente que refleja la energía de excitación de los electrones de capas internas, dando paso a la selectividad atómica de la técnica.*

*(c) por encima del borde, una estructura oscilatoria que modula la absorción. La primera característica ilustra el fenómeno de absorción de rayos X, descrito por la "regla de oro" de Fermi, la posición en energía del borde descrita en la segunda característica es única para un determinado átomo absorbente y refleja la energía de excitación de los electrones de capas internas, dando paso a la selectividad atómica de la técnica [121]. La tercera característica es justamente la que presenta interés en la estructura fina de la absorción de rayos X, EXAFS. Cuando es correctamente interpretada, contiene información estructural detallada, como distancias interatómicas y números de coordinación.*

*Entre las energías antes y después del K-edge, habitualmente se reconocen dos regiones principales en el espectro (Fig. 9):*

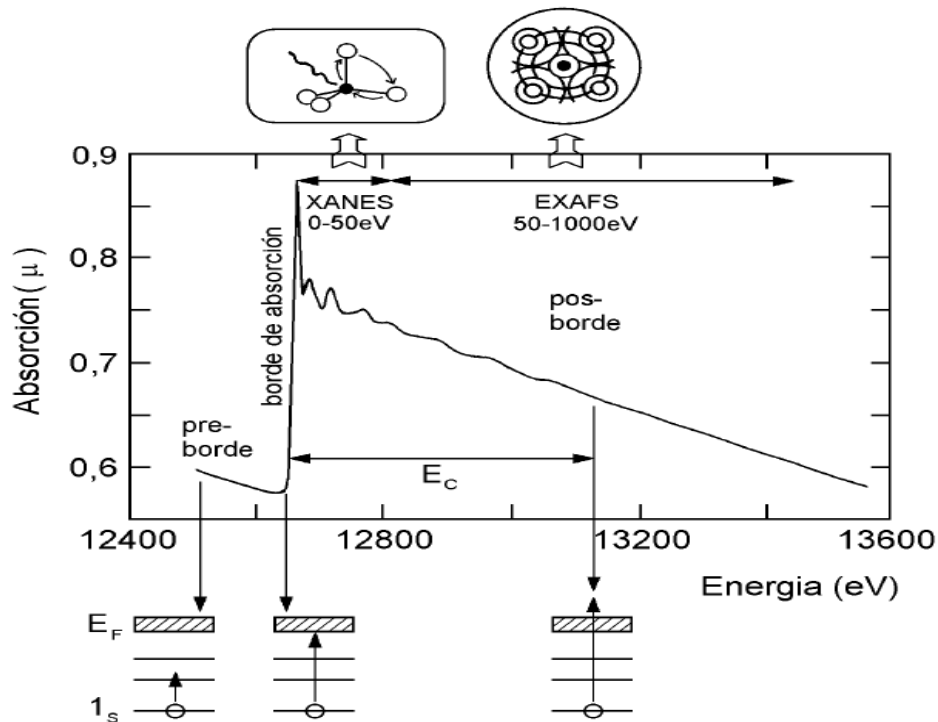


Figura 9. Representación esquemática de un espectro de absorción de rayos X y las transiciones electrónicas que corresponden esas características básicas del espectro [122].

**A** - región del pre-borde: se refiere a las transiciones electrónicas con absorción de energía menor que la energía de enlace, esto ocurre cuando el átomo absorbente posee estados desocupados o parcialmente desocupados por debajo del nivel de Fermi. Tales transiciones tienen pocas probabilidades y, por lo tanto, producen solamente pequeñas oscilaciones en el espectro de absorción. La posición exacta del pico depende de los detalles del estado de oxidación, tipo de simetría del sitio (octaédrica, tetraédrica, etc.) y de la naturaleza del enlace.

**B** - Borde de absorción (K-edge): región caracterizada por un aumento abrupto de la absorción cuando la energía absorbida resulta suficiente para extraer electrones del átomo absorbente.

**C** - Transiciones para los estados del continuo: corresponden a la absorción de fotones con energías mayores que la energía de ligadura atómica, de manera que ocurren transiciones para estados del continuo, no localizados en el átomo absorbente y el exceso de energía es cargada por el fotoelectrón en forma de energía cinética. Esta región se sub-divide en dos:

- La región XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure)

## 1. INTRODUCCIÓN

- *La región EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure)*

*Finalmente, podemos enumerar algunas características de la espectroscopia de absorción de rayos X que la vuelven una herramienta única en estudios estructurales:*

*i. La energía de ligadura de los electrones internos es una característica de cada átomo y, por ello, XAS (XANES y EXAFS) es una técnica que posee selectividad atómica.*

*ii. XAS sondea la estructura en la vecindad del átomo excitado, esto es, el ordenamiento a corto alcance;*

*iii. resulta posible estudiar la estructura local alrededor de átomos en una matriz, por más que éste se encuentre en concentraciones muy bajas;*

*iv. debido a su carácter local, el formalismo de la retrodispersión es aplicable tanto para materiales en estado gaseoso como a la materia condensada, que está en estado líquido, vítreo o cristalino [121].*

### **1.2.2.3 Absorción de rayos X cercano al borde de absorción (del inglés, X-ray Absorption Near Edge Structure , XANES)**

*La región XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure): está comprendida en la región de hasta unos 50 eV por encima del borde de absorción, sobre esta región suele haber variaciones intensas de la absorción. El espectro XANES trabaja en la región donde la longitud de onda del fotoelectrón es del orden de las distancias interatómicas y, por ello, su camino libre medio es lo suficientemente largo como para que le ocurran dispersiones múltiples antes de que regrese al átomo central. De este modo, el espectro XANES involucra dispersiones múltiples y transiciones a estados desocupados, siendo rico en informaciones cristaloquímicas del átomo absorbente, como el estado de oxidación, la densidad de estados desocupados y la estructura cristalina en que está inmerso el átomo absorbente [123].*

#### **1.2.2.3.1 Tratamiento de datos XANES**

*El espectro XANES permite determinar la coordinación, simetría y geometría del entorno, el estado de oxidación, los niveles de ocupación de orbitales y la inversión catiónica entre otras posibilidades. Esto es posible a partir del análisis de las características distintivas de*

*un espectro de absorción de rayos X en la región cercana al borde de absorción de los niveles electrónicos profundos del átomo.*

*La posibilidad de interpretar, de forma empírica, es el resultado de la obtención de todos datos experimentales, de los que pueden extraerse determinadas regularidades que se corresponden con algunos aspectos de la naturaleza del sistema estudiado. En este sentido se entienden a los espectros XANES como una “huella digital” que pudiéramos resumir en las siguientes características:*

- *Posición e Intensidad de las transiciones electrónicas Región de Pre-borde.*

*Esta región está caracterizada por las transiciones que ocurren entre estados ligados de niveles profundos y estados ligados desocupados localizados inmediatamente por debajo del nivel de vacío (a pocos eV de la energía umbral de ionización  $E_0$ ). Este tipo de transiciones dependen, en primer orden, del estado de oxidación y de la geometría local, y también la forma e intensidad de la transición depende de la distribución de espín [124].*

*En la región pre-borde, los estados indicados están asociados con distorsiones geométricas de los entornos (ruptura de simetrías de inversión) lo que transforma en permitidas las transiciones dipolares que en otro caso son prohibidas. En la teoría de orbitales moleculares esto puede ser interpretado como una mezcla de orbitales desocupados accesibles [125].*

*Por todo lo anterior, es necesario el estudio de compuestos de referencia bien conocidos estructural y electrónicamente, tanto por espectroscopia de rayos X, como por otras técnicas convencionales como ICP-MS, teniendo como objetivo conocer las características de los pre-bordes, correlacionando la intensidad y la energía de cada uno de ellos con geometría y el estado de oxidación del elemento absorbente.*

- *Posición en energía del Borde de Absorción*

*Se ha demostrado, para toda una serie de compuestos químicamente similares (i.e., óxidos de un mismo metal), que en las transiciones electrónicas de estados ligados existe una relación lineal entre la posición en energía del borde de absorción  $E_0$  y el estado de oxidación formal [126]. Es decir, la comprobación de esta regla general permite conocer estados de oxidación promedio de diferentes compuestos mediante la medición de la posición en energía del borde de absorción para ciertos óxidos de referencia; para ello se*

## 1. INTRODUCCIÓN

*necesita una buena calibración en energía de las medidas, que generalmente se logra con la medida de una referencia metálica antes de las mediciones de las muestras.*

*El hecho de que existan desplazamientos del borde de absorción para diferentes estados de oxidación [125] está relacionado con las interacciones entre la densidad electrónica de los estados finales y la densidad electrónica con huecos en los estados ligados más profundos.*

### *- Ajuste de picos de los espectros de absorción*

*En procesos de fotoabsorción y fotoionización, en general, es típica la aparición de picos de absorción por encima de la energía  $E_0$  del borde bajo estudio. Estos picos se denominan picos de resonancia (o de resonancia en el continuo). Para describir este proceso existen dos modelos:*

*A) Un electrón eyectado es atrapado por una barrera de potencial, de la cual puede emerger hacia el continuo por efecto túnel, y*

*B) Las formas de resonancia se deben a la presencia de orbitales moleculares desocupados embebidos en el continuo [125].*

*Debe remarcarse que ambos enfoques son complementarios, y dan una descripción adecuada del fenómeno. La identificación de tales picos está afectada por la resolución (intrínseca y experimental), y no siempre puede realizarse una asignación sencilla.*

### **1.2.3 Procesamiento de datos**

*Se recoge en este apartado un resumen de las técnicas de análisis de datos utilizadas en los diferentes estudios realizados.*

*En general, podemos afirmar que es necesario usar herramientas estadísticas y matemáticas para el análisis, de nuestros datos obtenidos. La enorme cantidad de datos, sin duda, necesita de la combinación de análisis multivariantes y herramientas de visualización para extraer información significativa de manera eficiente. Usando el análisis multivariante se pueden clasificar los datos espectrales mediante técnicas (supervisadas o no supervisadas) y analizarlos usando regresión multivariante (lineal o múltiple). Los métodos multivariantes de clasificación de datos son numerosos.*



Los usados en este trabajo fueron los siguientes:

- ✓ *Análisis de componentes principales (del inglés, principal component analysis PCA)*
- ✓ *Análisis discriminante con mínimos cuadrados parciales (del inglés, partial least squares - discriminat analysis, PLS-DA)*
- ✓ *Análisis mediante el ajuste por combinación lineal (del inglés, lineal combination fitting, LCF)*

### **1.2.3.1 Análisis de Componentes Principales (del inglés, Principal Component Analysis, PCA)**

PCA, es una de las técnicas de análisis estadístico multivariante más empleada. Esencialmente, la PCA es una transformación de las variables reales a unas nuevas coordenadas ortogonales (Componentes Principales, PC), que tiene por objetivo la reducción de las variables que definen el sistema, pudiendo así manifestar relaciones o estructuras que no son evidentes con la observación directa de los datos originales [127].

Los principales datos que se pueden extraer de una PCA son:

- *El análisis cuantitativo de los resultados*
- *Las tendencias que siguen los datos del sistema estudiado.*

El análisis de PCA transforma las variables originales (posiblemente correlacionadas) en unas nuevas variables ortogonales, haciendo que la matriz de datos originales se reduzca de tamaño. Todo eso se hace sin que se pierda información significativa (figura 10).

#### El procedimiento

Las nuevas variables, que reciben el nombre de Componentes Principales (PC), son combinaciones lineales de las variables originales, pero que no corresponden a ninguna característica química del sistema; son unas nuevas variables "abstractas". El peso de cada variable original en cada PC recibe el nombre de "loading". Cada una de las muestras en estudio queda representada por unos valores correspondientes a cada loading, llamados "scores". Así, es posible expresar la matriz de datos original ( $X$ ) en función de las matrices de scores ( $T$ ) y de los loadings ( $P^T$ ) según la ecuación:

## 1. INTRODUCCIÓN

$$X = T P^T + E$$

Dónde:

*E* expresa el error aleatorio que contengan los datos, que incluye la varianza contenida en todos los PC que no se consideran en la creación del nuevo modelo.

El procedimiento empleado por el método para determinar los nuevos PCs sigue el algoritmo NIPALS (Non-linear Iterative Partial Least Squares). Se define un nuevo vector, cuya dirección será la máxima variabilidad de los datos; este será el primer PC.

A continuación se hace rotar un segundo vector sobre la posición del origen, manteniéndose en dirección ortogonal en relación con el primero, hasta encontrar la dirección de máxima variabilidad de los datos. Se repite este procedimiento para las diferentes PCs, representando cada vez el porcentaje de la variabilidad del sistema más pequeño. La figura 8 representa las selecciones de las PCs y su colocación vectorial. [127].

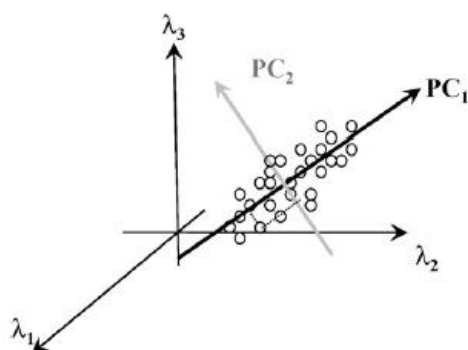


Figura 10. Ejemplo teórico de una captura de las variaciones en un análisis de PCA [128].

El tratamiento de los espectros XANES con PCA requiere como condición inicial espectros con una buena relación señal ruido, una buena calibración en energía y realizar todo el tratamiento de los datos siguiendo una misma sistemática en los espectros.

Para este estudio, la normalización, calibración y eliminación de fondo se llevó a cabo utilizando el software XANES dactiloscope (K. Klementiev®) para el caso del Jamón y el

programa Athenas (Demeter 0.9.13 Bruce Ravel®) para el tratamiento de las muestras de ostras.

Nuestras variables (espectros) fueron modeladas como una combinación lineal de componentes individuales (no correlacionadas) llamadas factores, Figura 11.

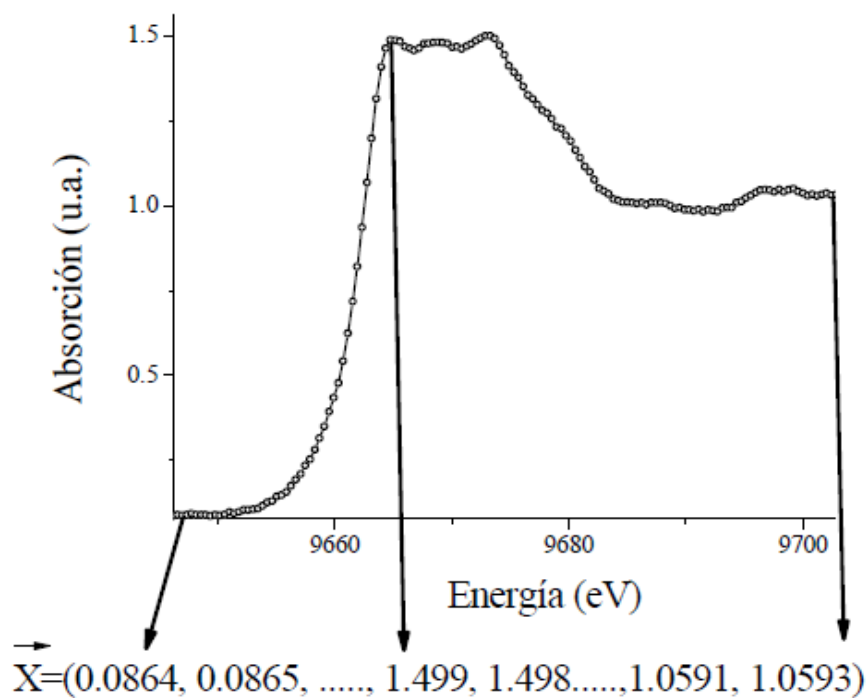


Figura 11. Espectro de absorción de un compuesto de Zn, donde se observa el vector de datos X correspondiente al valor de la absorbancia del espectro en cada punto de energía.

Una propiedad importante de este método es que cada factor hace la máxima contribución a la suma de la varianza de las variables. Consecuentemente, una situación típica en la que resulta útil el método es en la reducción de un gran número de datos a un conjunto manejable (interpretable) de funciones base (espectros). La matriz de datos, se compone de

## 1. INTRODUCCIÓN

*c* espectros, y habitualmente se pueden tener más espectros que componentes del vector *D* (el número de componentes es *r*) (Figura 12).

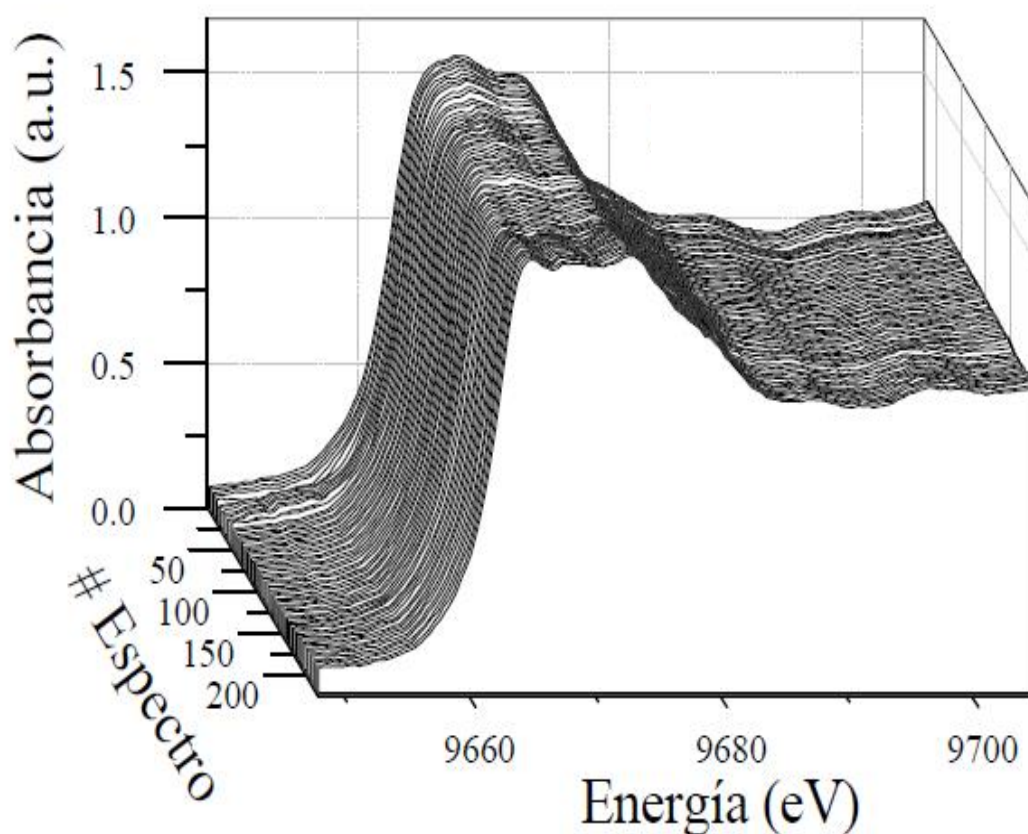


Figura 12. Matriz de datos de espectros XANES. Cada espectro es un vector de la matriz.

El objetivo del análisis de componentes principales es expresar la matriz de datos *D* en una nueva base que nos permita filtrar el ruido experimental y revele las variables relevantes del conjunto de datos. Permittiéndonos distinguir qué variables son importantes, cuáles son redundantes y cuáles resultan ser sólo ruido [129].

*El análisis de componentes principales se realiza descomponiendo la matriz de datos  $D$  de  $r$  filas y  $c$  columnas en una matriz fila,  $R$ , que contiene los componentes principales o factores y una matriz columna,  $C$  que contiene el peso o concentración de las componentes correspondiente de cada factor.*

$$D_{r \times c} = R_{r \times n} \cdot C_{n \times c}$$

*Esta descomposición se lleva a cabo, realizando una diagonalización de la matriz de covarianza de  $D$  ( $Z = D^T \cdot D$ ; donde  $D^t$  es la matriz traspuesta de  $D$ ). Debido al gran número de datos que hay que manejar, esto habitualmente se realiza con el auxilio de un ordenador y un programa adecuado, en nuestro caso se utilizó el programa XANES dactyloscope (K.Klementiev ©2013), que se vale del algoritmo de Target Transformation.*

### **1.2.3.2 Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (del inglés, Partial Least Squares-Discriminat Analysis, PLS-DA).**

*Es un método supervisado de análisis que se basa en la regresión en mínimos cuadrados parciales [130]. Las variables independientes ( $X$ ) pueden ser el espectro o el cromatograma de cada muestra, mientras que la variable dependiente  $Y$  es una variable categórica, definida por el analista, que codifica cada clase de manera numérica. Habitualmente, la matriz  $Y$  consta de números enteros [131]. El resultado de la regresión son valores de  $Y$  cercanos a los que indican cada categoría. Una muestra del conjunto de predicción se considera que está correctamente categorizada si cumple dos criterios: debe tener un perfil cromatográfico o espectral que no sea significativamente diferente de los perfiles de las muestras que forman el conjunto de calibración y el valor calculado de la variable categórica debe estar dentro de un intervalo de valores alrededor del número con el que se codifica la categoría (cut - off value), es decir, donde se han definido previamente el número de clases y de muestras que pertenecen a cada una de ellas. Cuanto mayor es la diferencia entre dos clases dadas, mayor es la distancia de Mahalanobis entre ellas. La discriminación de las muestras se consigue mediante el cálculo de la distancia de Mahalanobis de cada una de ellas a los centros de los grupos considerados. Una muestra desconocida se clasifica como perteneciente al grupo con el cual tenga una distancia más cercana al centro. El PLS-DA puede considerarse similar al PCA sólo en el sentido de que ambos determinan un*

## 1. INTRODUCCIÓN

hiperplano con un menor número de variables en el cual se proyectan los datos de las muestras desde un plano con más variables. Sin embargo, el PCA selecciona la dirección que retiene la máxima estructura entre los datos, mientras que el PLS-DA selecciona la dirección en la que se consigue una separación máxima entre los grupos definidos. En la construcción de este modelo se debe tener en consideración que se requiere un mayor número de muestras que de variables [131, 132].

En la construcción del modelo PLS-DA, la matriz  $X$  se compone de las huellas dactilares espectrales y el vector  $Y$  es un conjunto de variables categóricas que indica a qué clase pertenecen los objetos.

Los valores estadísticos evaluados en la construcción de los modelos de calibración incluyeron RMSEC (root mean square error of calibration), RMSECV (root mean square error of cross validation) y el coeficiente de determinación  $r^2$ .

Los espectros sin tratar fueron exportados desde el programa Spectral SScanner (v4.5) CVSRL, Inc., Italia como archivos de imagen de banda NIR para el análisis de datos. La construcción de los modelos de PCA y PLS-DA fue realizada utilizando el programa Unscrambler (v 10.3; CAMO, Oslo, Noruega).

### **1.2.3.3 Análisis mediante el ajuste de combinación Lineal (del inglés, Lineal Combination Fitting, LCF)**

El ajuste de combinación lineal, es un método de análisis para la interpretación de XANES o datos EXAFS utilizando estándares de referencias. Este método establece que los datos de una muestra desconocida (muestra) se pueden entender como una superposición lineal de los datos de dos o más conocidos (referencias), el análisis de LCF, por lo tanto, nos dice que fracción de la muestra desconocida se explica por cada referencia conocida, en otras palabras, el resultado del ajuste es la fracción de cada referencia en la muestra analizada, así como sus incertidumbres del análisis [133].

La manera de hacer este ajuste es realizando un “encaje combinatorio” donde el conjunto de referencias se comparan con los datos de la muestras desconocida en todas las combinaciones posibles, dando como resultado varias combinaciones ordenadas por los

*parámetros estadísticos del ajuste más cercano a los datos de las muestras. Se considera que el ajuste más cercano a los datos de la muestra es aquel que cuyo valor del factor de combinación, "R" es el número más pequeño de todas las combinaciones [134].*

## 1. INTRODUCCIÓN

### Referencias del capítulo

- [1] Guàrdia M.D., Guerrero L., y Arnau (2005). *Desarrollo de una guía metodológica estándar para la evaluación sensorial de jamón curado español de cerdo blanco Libro de actas del VI Congreso Mundial del Jamón sobre Ciencia, Tecnología y Comercialización*. Lugo, Septiembre 2011.
- [2] Acosta, V. y Lodeiros, C. (2001). *Evaluación del efecto del cobre sobre juveniles del mejillón verde Perna viridis mediante la concentración de ADN, y relación RAN/ADN en el músculo abductor*. *Rev. Científica – Luz*, 11(6):485-490.
- [3] Carusso, J.A., Klaue, B., Michalke, B., Rocke, D.M., 2003. *Group assessment: elemental speciation*. *Ecotox. Environ. Safe.*, 56, 32-44
- [4] Hirose, K., 2006. *Chemical speciation of trace metals in seawater: a review*. *Anal. Sci.*, 22, 1055-1063
- [5] Frimmel, F.H., Gremm T., 1994. *The importance of element speciation water analysis - a plea for further investigations*. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350, 7-13.
- [6] Tack, F.M., Verloo, M., 1995. *Chemical speciation and fractionation in soil and sediment heavy metal analysis: a review*. *Int. J. Environ. An. Ch.*, 59, 225-238
- [7] Michalke, B., 2003. *Element speciation definitions, analytical methodology and some examples*. *Ecotox. Environ. Safe.*, 56, 122-139
- [8] Sigg, L., Black, F., Buffle, J., Cao, J., Cleven, R., Davidson, W., Galceran, J., Gunkel, P., Kalis, E., Kistler, D., Martin, M., Nol, S., Nur, Y., Odzak, N., Puy, J., van Rimsdijk, W., Temminghoff, E., Tercier Waeber, M.L., Toepperwien, S., Town, R.M., Unsworth, E., Warnken, K.W., Weng, L., Xue, H., Zhang, H., 2006. *Comparasion of analytical techniques for dynamic trace metal speciation in natural freshwaters*. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 1934-1941
- [9] Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.G. Muntau, H., Van Leeuwen, H.P., Lobinski, A.R., 2000. *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendation 2000)*. *Pure Appl. Chem.*, 72, 1453-1470.
- [10] Gonzalez, A., Cervera, M.L., Armenta, S., de la Guardia, M., 2009. *A review of non-chromatographic methods for speciation analysis*. *Anal. Chim. Acta*, 636, 129-157
- [11] Hill, S.J., 1999. *Speciation of trace metals in the environment*. *Chem. Soc. Rev.*, 26, 291-296
- [12] Michalke, B., 1999. *Quality control and reference materials in speciation analysis*. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363,439-445
- [13] Davidson, M.C., Lorna, E.W., Ure, A.M., 1999. *Effect of sample preparation on the operational speciation of cadmium and lead in freshwater sediment*. *Fresen. J. Anal. Chem.*, 363, 134-136
- [14] Ure, A.M, Davidson, C.M., 2002. *Chemical Speciation in the environment*, 2 edition. Ed. Blackwell Science Ltd.
- [15] Szpunar, J., Lobinski, R., 1999. *Speciation in the environmental field – trends in analytical chemistry*. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363, 550-557.
- [16] Kot, A., Namiesnik, J., 2000. *The role of speciation in analytical chemistry*. *Trends Anal. Chem.*, 19, 69-79
- [17] Nordberg, M., Templeton, D.M., Andersen, O., Duffus, J.H., 2009. *Glossary of terms used in ecotoxicology (IUPAC Recomendatios 2009)*. *Pure Appl. Chem.*, 81(5), 829-970.
- [18] Kot A., Namiesnik J., *The role of speciation in analytical chemistry, trends in analytical chemistry*, vol. 19, nos. 2+3, 2000
- [19] Calace, N., Petronio, B.M., Pietroletti, M., 2006. *Metal bioavailability: how does its significance change in the time*. *Ann. Chim-Rome*, 96.
- [20] Gray, J.S., 2002. *Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist*. *Mar. Pollut. Bull.*, 45, 46-52.
- [21] Crompton, T.R., 1997. *Toxicants in aqueous ecosystems*. John Wiley & Sons, Chichester (England)
- [22] DesGranges, J.L., Rodrigue, J., Tardif, B., Laperle, M., 1998. *Mercury accumulation and biomagnification in ospreys (Pandion haliaetus) in the James Bay and Hudson Bay Regions of Québec*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 35, 330-341.
- [23] Fernández, J.A., Carballeira, A., 2001. *A comparison of indigenous mosses and topsoils for use in monitoring atmospheric heavy metal deposition in Galicia (NW Spain)*. *Environ. Pollut.*, 114 (3), 431-441.
- [24] Kennish, M.J., 1986. *Ecology of Estuaries, Vol. I: Physical and Chemical Aspects*. Ed. CRC Press,



Boca Ratón, Florida.

- [25] Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C., Ruedel, H., 2003. *Lessons from case Studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk*. *Ecotox. Environ. Safe*, 56, 45-51.
- [26] Peijnenburg, W.J.G.M., Jager, T., 2003. *Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues*. *Ecotox. Environ. Safety*, 56, 63-77.
- [27] Worms, I., Simon, D.F., Hassler, C.S., Wilkinson, K.J., 2006. *Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake*. *Biochimie*, 88, 1721-1731.
- [28] Pickering, L.W.F., 2002. *Chemical Speciation in the environment*, 2 edition. Chapter 2: *General strategies for speciation*. Ed. Blackwell Science Ltdd.
- [29] Apostoli, P., Cornelis, R., Duffus, J., Lison, D., Templeton, D., 2006. *Elemental speciation in human health risk assessment, Environmental health criteria 234*. Ed. World Health Organization. I.S.B.N.: 92 4 127232 5.
- [30] Cornelis, R., Nordberg, R., 2007. *Handbook on the toxicology of metal*, 3 edition. Chapter 2: *General chemistry, sampling, analytical methods, and speciation*. Academy Press, Inc.
- [31] Sanchez, J.E., 1994. *Speciation of metals in environment samples*. *Química e Industria*, 41 (2), 25-34.
- [32] Bayer, M.E., Boond, A.M., Mc Laughlin, R.J.M., 1975. *Simultaneous polarographic determination of ferrous, ferric, and total iron in standard rocks*. *Anal. Chem.*, 47 (3), 479-482.
- [33] Buffle, J., Tercier-Waeber, M.L., 2005. *Voltametric environmental trace metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements*. *Trends Anal. Chem.*, 24 (3), 172-191.
- [34] Pérez-Bendito, D., Rubio, S., 1999. *Comprehensive analytical chemistry: Volume XXXII: Environmental analytical chemistry*. Wilson & Wilson, Ed. S.G. Weber, ELSEVIER, 842pp.
- [35] Town, R.M., Filella, M., 2000. *A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters*. *Aquat. Sci.*, 62, 252-295.
- [36] Moffett, J.W., Zika, R.G., 1988. *Measurement of copper (I) in surface waters of the subtropical Atlantic and Gulf of Mexico*. *Geochim. Cosmochim.*, 52 (7), 1849-1857.
- [37] Greenway, G.M., 2002. *Chemical Speciation in the environment*, 2 edition. Chapter 4: *Hybrid methods of speciation*. Ed. Blackwell Science Ltdd.
- [38] Van Loon, J.C., 1981. *Review of methods for elemental speciation using atomic spectrometry detectors for chromatography*. *Can. J. Spectrosc.*, 26(4), 22A-32A.
- [39] Sun, H., 1982. *Analysis of metal speciation by combined chromatography and atomic absorption*. *Fenxi Huaxue*, 10(2), 117-224.
- [40] Ebdon, L., Hill, S., Ward, R.W., 1986. *Directly coupled chromatography - atomic spectroscopy. Part 1. Directly coupled gas chromatography - atomic spectroscopy. A review*. *Analyst*, 111, 10, 1113-1138.
- [41] Ebdon, L., Hill, S., Ward, R.W., 1987. *Directly coupled chromatography - atomic spectroscopy. Part 2. Directly coupled liquid chromatography - atomic spectroscopy. A review*. *Analyst*, 112, 1, 1-16.
- [42] Ebdon, L., Hill, S., 1988. *Combined high performance liquid chromatography - atomic spectroscopy for trace metal speciation*. *Anal. Appl. Spectrosc.*, [Proc. Int. Conf.], Meeting Date 1987, 355-366.
- [43] Quevauviller, Ph., 1996. *Atomic spectrometry hyphenated to chromatography for elemental speciation: performance assessment within the standards, measurements and testing program (Community Bureau of Reference) of the European Union*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 11(12), 1225-1231.
- [44] Chen, X., Ma, J., Huang, Z., Han, S., 1998. *Element speciation by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma-atomic emission spectrometric detection*. *Yankuang Ceshi*, 17(1), 51-57.
- [45] de la Guardia, M., Cervera, M., 1999. *Speciation studies by atomic spectroscopy*. *Adv. Atom. Spectrosc.*, 5, 1-98.
- [46] de Campos, R.C., Grinberg, P., 2001. *Gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry in studies of speciation: a review*. *Quimica Nova*, 24(2), 220-227.
- [47] Guéguen C., Gilbin R., Pardos M., Dominio J., 2004. *Water toxicity and metal contamination assessment of a polluted river: The Upper Vistula River (Poland)*. *Appl. Geochem.*, 19, 153-162.
- [48] Ederman M. A., Watts B.M., 1957 *Spectrophotometric determination of color change in cured meat*. *Agricultural and food chemistry*, Vol 5, No.6, 453-455.
- [49] Fraga C., *Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health*. 2005, *Molecular Aspects of Medicine* 26, 235-244

## 1. INTRODUCCIÓN

- [50] Wakamatsu, J., Odagiri, H., Nishimura, T., & Hattori, A (2006). Observation of the distribution of Zn protoporphyrin IX (ZPP) in Parma ham by using purple LED and image analysis. *Meat Science*, 74, 594-599.
- [51] GUIA\_TRAZABILIDAD\_PALERMO Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición Alcalá, 56 - 28071 Madrid.
- [52] Bradl, H.B, Kim, C., Kramar, U., Stüben, D., 2005. *Heavy Metals in the environment. Chapter 2: Interactions of heavy metals.* Ed. H.B. Bradl.
- [53] FOX J., 1966, *The Chemistry of Meat Pigments.* Food Processing. Vol. 14, No 3, 207-210.
- [54] Rodríguez-Nuñez E., Aristoy M.C., Toldra F., 1994, Peptide generation in the processing of dry-cured ham. *Food chemistry* 53, 187-190.
- [55] Bañon S., Cayuela J. M., Granados M.V., Garrido M.D., 1999, Pre-cure freezing affects proteolysis in dry-cured hams. *Meat Science* 51, 11-16.
- [56] Ruiz J., Garcia C., Diaz M., Cava R., Tejeda J.F., Ventanas J., 1999, Dry cured Iberian ham non-volatile components as affected by the length of the curing process. *Food Research Internacional* 32, 643-651.
- [57] Parolari G., Gabba L., Saccani G., 2003, Extraction properties and absorption spectra of dry cured hams made with and without nitrate. *Meat Science* 64, 483-490.
- [58] Wakamatsu J., Nishimura T., Hattori A., 2004, A Zn-porphyrin complex contributes to bright red color in Parma ham. *Meat Science* 67, 95-100.
- [59] Møller J.K.S., Adamsen C.E., Catharino R.R., Skibsted L.H., Eberlin M. N., 2007, Mass spectrometric evidence for a zinc-porphyrin complex as the red pigment in dry-cured Iberian and Parma ham. *Meat Science* 75, 203-210.
- [60] Ishikawa H., Kawabuchi T., Kawakami Y., Sato M., Numata M., Matsumoto K. 2006, Formation of Zinc Protoporphyrin IX and Protoporphyrin IX from Oxymyoglobin in Porcine Heart Mitochondria. *Food Sci. Technol. Res.*, 13 (1), 85-88.
- [61] Martínez-Sánchez, M.J., Navarro, M.C., Pérez-Sirvent, C., Marimón, J., Vidal, J., García-Lorenzo, M.L., Bech, J., 2008. Assessment of the mobility of metals in a mining-impacted coastal area (Spain, Western Mediterranean). *J. Geochem. Explor.*, 96, 171-182.
- [62] Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta*, 606, 135-150.
- [63] Raimundo, J.; Pereira, P.; Vale, C. y Caetano, M. 2005. Concentraciones de Fe, Zn, Cu y Cd en la glándula digestiva y los tejidos musculares de *Octopus vulgaris* y *Sepia officinalis* de dos zonas costeras de Portugal. *Ciencias Mar.*, 31(1B): 243-251.
- [64] PHILIP S. RAINBOW. 1995, Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 31, Nos 4-12, pp. 183-192, 1995.
- [65] Manu Soto, Mike Kortabitarte, Ionan Marigomez, 1995, Bioavailable heavy metals in estuarine waters as assessed by metal shell-weight indices in sentinel mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol Prog Ser*, Vol. 125: 127-136.
- [66] Philip S. Rainbow, 2002, Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?, *Environmental Pollution* 120, 497-507.
- [67] Philip S. Rainbow, 2007, Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity, *Environment International* 33, 576-582.
- [68] Wen-Xiong Wang, Philip S. Rainbow, 2008, Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 148, 315-323.
- [69] José Usero, José Morillo, Ignacio Gracia, 2005, Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain, *Chemosphere* 59, 1175-1181.
- [70] Chuvieco, E. *Fundamentos de Teledetección Espacial.* Ediciones Rialp, 1999.
- [71] Landgrebe, D., "Hyperspectral Image Data Analysis", *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 19, no. 1, pp. 17-28, 2002.
- [72] T. Hyvarinen, E. Herrala, A. Dall'Ava, in: *Proceedings of SPIE Electronic Imaging*, 3302, San Jose, CA, USA (1998).
- [73] P. Geladi, H. Grahn, J. Burger, in: H. Grahn, P. Geladi (Eds.), *Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis*, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2007, pp. 1-15.
- [74] A.A. Gowen, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, G. Downey, J.M. Frias, *Hyperspectral imaging – an emerging process analytical tool for food quality and safety control*, *Trends Food Sci. Technol.* 18 (2007) 590-598.
- [75] D.-W. Sun (Ed.), *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control*, Academic Press/Elsevier Ed., San Diego CA, 2010.
- [76] V. Baeten, J.A. Fernandez Pierna, P. Dardenne, in: H. Grahn, P. Geladi (Eds.), *Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis*, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2007, pp. 289-311.

- [77] F. Pierna, J.A.V. Baeten, P. Dardenne, E.N. Lewis, J. Dubois, J. Burger, in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Oxford, UK, 2009, pp. 173–196.
- [78] Gowen A, Taghizadeh M, Gaston E, O’Gorman A, Cullen P., Frias J., Esquerre C., Downe G. y *Hyperspectral imaging for the investigation of quality deterioration in sliced mushrooms (Agaricus bisporus) during storage. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety, September 2008, Volume 2, Issue 3, pp 133-143, Pharm.Biopharm.69 (2008) 10–22.*
- [79] W.FortunatodeCarvalhoRocha,G.PostSabin,P.H.Marc-o, R.J.Poppi, *Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics Chemom. Intell.Lab.Syst.106(2011)198–204.*
- [80] R.Jolivot,P.Vabres,F.Marzani, *Reconstruction of hyperspectral cutaneous data from an artificial neural network-based multispectral imaging system Comput.Med.ImagingGraph.5(2011) 85–88.*
- [81] F.Blanco,M.Lopez-Mesas, S.Serranti,G.Bonifazi,J.Havel,M.Valiente, *J. Biomed.Opt.17(2012)076027-1-076027-12.*
- [82]M.Kubik,in:D.Creagh,D.Bradley(Eds.),*PhysicalTechniquesintheStudyofArt, ArchaeologyandCulturalHeritage,Elsevier,NewYork,2007, pp. 199–259.*
- [83] R.Gosselin,D.Rodrigue,C.Duchesne. *A hyperspectral imaging sensor for on-line quality control of extruded polymer composite products, Comput.Chem.Eng.35(2011) 296–306.*
- [84] G.Bonifazi,S.Serranti. *Imaging spectroscopy based strategies for ceramic glass contaminants removal in glass recycling WasteManage.26(2006)627–639.*
- [85] G.Bonifazi,S.Serranti. *Hyperspectral imaging applied to end-of-life concrete recycling Proc.SPIE6377,U151-U160,Bellingham,WA,USA <http://dx.doi.org/DOI:10.1117/12.684661> (2006).*
- [86] G.Bonifazi,S.Serranti,*Proc.SPIE6755,0B1-0B8,Bellingham,WA,USA<http://dx.doi.org/DOI:10.1117/12.735803> (2007).*
- [87] G.Bonifazi,S.SerrantiA.Bonoli,A.Dall’Ara,inC.A.Brebbia,M.Neophytou, E. Beriatosetal.(Eds.),*Sustainable development and planningIV,Book Series: WITTransactionsonEcologyandtheEnvironment,120,885-894.WIT Press, Southampton,Boston,ISBN:978-1-84564-422-2.*
- [88] S. Serranti, A. Gargiulo, G. Bonifazi, *Characterization of post-consumer polyolefin wastes by hyperspectral imaging for quality control in recycling proces Waste Manage. 31 (2011) 2217–2227.*
- [89] S. Serranti, A. Gargiulo, G. Bonifazi, *Classification of polyolefins from building and construction waste using NIR hyperspectral imaging system Resour. Conserv. Recycl. 61 (2012) 52–58.*
- [90] A. Del Fiore, M. Reverberi, A. Ricelli, F. Pinzari, S. Serranti, A.A. Fabbri, G. Bonifazi, C. Fanelli, *Early detection of toxigenic fungi on maize by hyperspectral imaging analysis Int. J. Food Microbiol. 144 (2010) 64–71.*
- [91] M.A. Shahin, S.J. Symons, *Detection of Fusarium damaged kernels in Canada Western Red Spring wheat using visible/near-infrared hyperspectral imaging and principal component analysis Comput. Electron. Agric. 75 (2011) 107–112.*
- [92] C.B. Singh, D.S. Jayas, J. Paliwal, N.D.G. White, *Identification of insect-damaged wheat kernels using short-wave near-infrared hyperspectral and digital colour imaging Comput. Electron. Agric. 73 (2010) 118–125.*
- [93] C.M. McGoverin, M. Manley, *Classification of maize kernel hardness using near infrared hyperspectral imaging J. Near Infrared Spectrosc. 20 (2012) 529–535.*
- [94] G. ElMasry, A. Iqbal, D.-W. Sun, P. Allen, P. Ward, *Quality classification of cooked, sliced turkey hams using NIR hyperspectral imaging system, J. Food Eng. 103 (2011) 333–344.*
- [95] *Hyperspectral imagin technology recurso en línea, <http://www.gildenphotonics.com/hyperspectral-imaging-/hyperspectral-imaging-technology.10/07/2015>*
- [96] Ariana, D., & Lu, R. (2006). *Visible/near-infrared hyperspectral transmittance imaging for detection of internal mechanical injury in pickling cucumbers. In: ASABE Annual International Meeting, Paper No. 063039, July 2006.*
- [97] Gómez, J. 2010. *Detección automática de podredumbres en cítricos mediante procesamiento avanzado de imágenes hiperespectrales. Universitat de València. Disponible en:<http://roderic.uv.es/handle/10550/23400>.*
- [98] Iqbal, A., Sun, D.-W., & Allen, P. (2013). *Prediction of moisture, color and pH in cooked, pre-sliced turkey hams by NIR hyperspectral imaging system. Journal of Food Engineering, 117, 42-51.*
- [99] Schaepman, M. E. (2007). *Spectrodirectional remote sensing: From pixels to processes. International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation, 9: 204–223.*
- [100] Elmasry, G.; Kamruzzaman, M.; Sun, D.; Allen, O. 2012. *Principles and Applications of Hyperspectral Imaging in Quality Evaluation of Agro-Food Products: A review.*

## 1. INTRODUCCIÓN

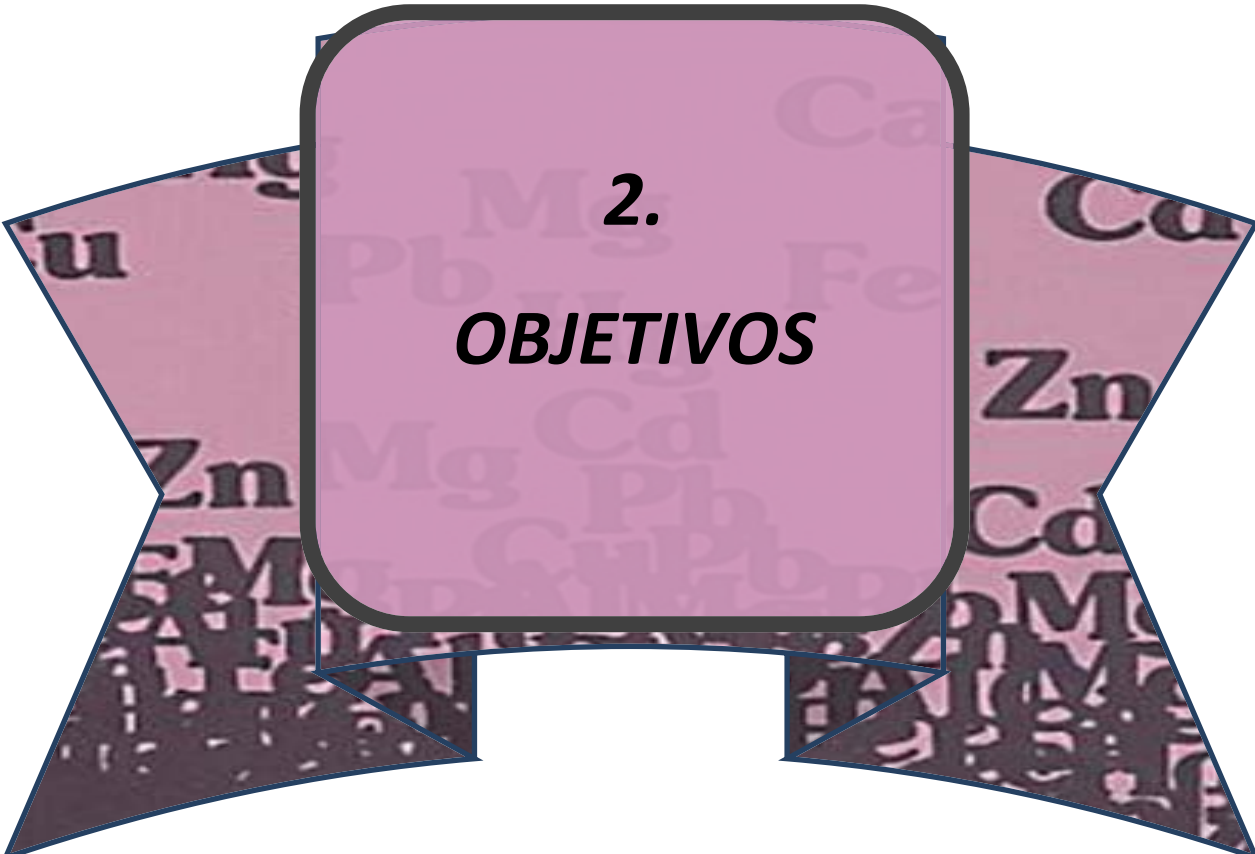
- [101] ElMasry, G.; Sun D. *Principles of Hyperspectral Imaging Technology. Chapter 1, Pag 3-39.*
- [102] Sjoström M, Wold S, Söderström B. Feature extraction, classification, mapping. In *Pattern Recognition in Practice II*, Gelsema ES, Kanal LN (eds). Elsevier: Amsterdam, 1989; 486.
- [103] Hughes G. F., "On The Mean Accuracy Of Statistical Pattern Recognizers", *IEEE Trans.Infor. Theory*, Vol. IT-14, 1968
- [104] Fukunaga K., "Introduction to Statistical Pattern Recognition" Publicado por Academic Press, 1990.
- [105] R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 772–777.
- [106] *Unscrambler User Manual*, Camo Software AS, pag. 232.
- [107] ElMasry, G., N. Wang, A. ElSayed and M. Ngadi. 2007. *Hyperspectral imaging for nondestructive determination of some quality attributes for strawberry. Journal of Food Engineering*, 81: 98–107
- [108] Chang, C.-I, Ren, H., "An Experiment-Based Quantitative and Comparative Analysis of Target Detection and Image Classification Algorithms for Hyperspectral Imagery". *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, vol. 38, no. 2, pp. 1044- 1063, 2000.
- [109] Stehman, S.V., "Selecting and Interpreting Measures of Thematic Classification Accuracy". *Remote Sensing of Environment*, vol. 62, pp. 77-89, 1997.
- [110] Stehman, S.V., "Selecting and Interpreting Measures of Thematic Classification Accuracy". *Remote Sensing of Environment*, vol. 62, pp. 77-89, 1997.
- [111] Richards, J. A., *Remote Sensing Digital Image Analysis: An Introduction*. Springer-Verlag, Berlin, 1993.
- [112] Sweet, J., Granaham, J., Sharp, M., "An Objective Standard for Hyperspectral Image Quality", en: *Proc. IX \_ASA/JPL Airborne Earth Science Workshop, Pasadena, CA, 2000.*
- [113] Plaza, A. Mueller, T. Skauli, Z. Malenovsky, J. Bioucas, S. Hofer, J. Chanussot, . Carrere, I. Baarstad, J. Nieke, T. Hyvarinen, P. Gamba, J. A. Benediktsson, M. E. chaepman and B. Zagajewski. "HYPER-I-NET: European Research Network on Hyperspectral Imaging", *IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium (IGARSS'07)*, Barcelona, Spain, 2007.
- [114] Liu, F.; He, Y. Classification of brands of instant noodles using Vis/NIR spectroscopy and chemometrics. *Food Res. Int.* 2008, 41, 562-567.
- [115] DESY-HasyLab Synchrotron Light Facility Website, (recurso en línea), [http://hasylab.desy.de/facilities/sr\\_and\\_fel\\_basics/index\\_enq.html](http://hasylab.desy.de/facilities/sr_and_fel_basics/index_enq.html), (15/05/2015).
- [116] J.D. Jackson, *Classical Electrodynamics* 3th edition, Chapter 14, John Wiley & Sons (1999).
- [117] J. J. Rehr, R. C. Albers, *Theoretical approaches to x-ray absorption fine structure*, *Rev. Mod. Phys.* 72, 621 (2000)
- [118] F.M.F. de Groot, *High-resolution X-ray emission and X-ray absorption spectroscopy* *Chem. Rev.* 101, 1779 (2001).
- [119] J.J. Rehr, A.L. Ankudinov, *Coord. Chem. Rev.* 249 (1-2), 131 (2005).
- [120] L. G. Parrat, *Electronic band structure of solids by x-ray spectroscopy* *Rev. Mod. Phys.* 31, 616 (1959).
- [121] GRANT BUNKER, *INTRODUCTION TO XAFS, A Practical Guide to X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy*, Cambridge University Press. Pag.134-135.
- [122] I.O. Mazali, *Exafs como técnica de caracterização estrutural de materiais: Fundamentos Teóricos e Aplicações*, Monografia, Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP (1998).
- [123] M. Fernandez-Garcia, *XANES analysis of catalytic systems under reaction conditions* *Catalysis Reviews*, 44 (1), 59 (2002).
- [124] G.A. Waychunas, *Synchrotron radiation XANES spectroscopy of Ti in minerals: effects of Ti bonding distances, Ti valence, and site geometry on absorption edge structure* *Am. Mineral.* 72, 89 (1987).
- [125] J. Wong; F.W. Lytle; R.P. Messner; D.H. Maylotte, *K-edge absorption spectra of selected vanadium compounds* *Phys. Rev. B* 30, 5596 (1984).
- [126] M.N. Piancastelli, *The neverending story of shape resonances* *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* 100, 167 (1999).
- [127] J.Schlens, disponible via web: <http://www.brainmapping.org/NITP/PNA/Readings/pca.pdf> (2005). [128] Gendrin, C., Roggo, Y., Collet, C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 48, 533-553.
- [129] Chen, Y.; Xie, M.; Yan, Y.; Zhu, S.; Nie, S.; Li, C.; Wang, Y.; Gong, X. *Discrimination of Ganoderma lucidum according to geographical origin with near infrared diffuse reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques.* *Anal. Chim. Acta* 2008, 618, 121-130.
- [130] Berrueta, L. A.; Alonso-Salces, R. M.; Héberger, K. *Supervised pattern recognition in food analysis.* *Journal of Chromatography A* 2007, 1158, 196-214.
- [131] Brereton, R. G. *Applied Chemometrics for Scientist*, John Wiley & Sons, Ltd, Great Britain, 2007.

[132] Liu, F.; He, Y. *Classification of brands of instant noodles using Vis/NIR spectroscopy and chemometrics. Food Res. Int.* 2008, 41, 562-567.

[133] Bruce Ravel, *Athena user's Guide, version 0.9.19, Enero 2014, pg 117-122.*

[134] S.D. Kelly, D. Hesterberg, B. Ravel, *Methods of Soil Analysis, Part 5, Mineralogical Methods, Soil Science Society of America, Medison, 2008, Ch. 14.*





**2.**  
**OBJETIVOS**

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

*El objetivo del presente trabajo de tesis es desarrollar metodologías para la determinación de biomarcadores en productos alimenticios específicos para evaluar tanto su trazabilidad, p.e, el jamón curado, como su papel indicador de contaminación en la monitorización del medio ambiente, p.e, molusco de mar (ostras y mejillones).*

### 2.2 Objetivos específicos

*Para la consecución de este objetivo general, se han llevado a cabo las siguientes tareas específicas:*

- ✓ *Adquirir conocimientos sobre las técnicas espectrales (HSI, XANES, EXAFS) y el análisis espectral correspondiente (incluyendo el manejo de herramientas y programas adecuados para trabajar con este tipo de datos en el procesamiento), necesarios para poder llevar a cabo el estudio (formato y representación de los datos).*
- ✓ *Trabajar con análisis multivariante sobre el procesamiento de los datos y establecer aquellas metodologías más adecuadas para el tipo de datos que se tratan.*
- ✓ *Verificar resultados espectrales de especiación química obtenidos mediante la técnica de Sincrotrón con resultados obtenidos para las mismas muestras mediante técnicas convencionales de especiación basadas en HPLC-ICP-MS.*
- ✓ *Aplicar la técnica de dilución isotópica en la identificación del origen de muestras alimentarias (jamón curado).*
- ✓ *Obtener conclusiones a partir del estudio cuantitativo y comparativo realizado, y plantear posibles trabajos futuros.*



**3.**

***METODOLOGÍA  
EXPERIMENTAL***



### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.1 Preparación de las muestras

Las muestras descritas a continuación, fruto del trabajo de investigación de esta tesis, son el material de estudio de un proyecto Europeo (ORQUE-SUDOE, programa interreg) y de la colaboración de varias empresas donantes de todas las muestras con las cuales hemos colaborado dentro del proyecto.

Para el jamón curado el proyecto Español fue el MEC-MICINN CTM2012-30970, las industrias colaboradoras han sido: El Señorío de Olivenza y la Fábrica de embutidos y Jamones Navarro.

Para los moluscos adquiridos como contribución dentro del proyecto Europeo ORQUE-SUDOE, han sido los mejillones de la federación de productores de moluscos del Delta del Ebro (FEPROMODEL) no obstante, se analizaron todas las demás muestras de moluscos provenientes de la contribución de los otros participantes en el proyecto que incluyen, en Francia (Arcachon y La Rochelle), Portugal (Lisboa y Aveiro) y España (País Vasco y Santander).

La caracterización de todas las muestras se ha realizado por medio del uso de la espectroscopia de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) teniendo como objetivo determinar el contenido metálico de nuestros dos biomateriales empleados (Jamón curado y moluscos), para así realizar un correcto uso de las técnicas de especiación directas utilizadas en este trabajo, además de hacer una interpretación adecuada de los resultados.

Tanto el jamón curado como los moluscos, siguieron el tratamiento que se le da a todo alimento para su análisis por ICP-MS [1, 2], y aunque se manejaron volúmenes diferentes en cada caso, todos los pasos realizados tenían la finalidad de conseguir unas muestras lo más homogéneas posible para su análisis.

Los pasos a seguir para la caracterización fueron los siguientes:

- A) Elección de la muestra a analizar
- B) Liofilización del biomaterial
- C) Pesada del material liofilizado
- D) Digestión de la muestra
- E) Determinación de metales en las muestras

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### F) Análisis de los resultados

Además, para ambas muestras se ha recibido la colaboración de centros especializados en caracterización y análisis de biomateriales en Pau, Francia.

En el caso de los moluscos, se tenía la finalidad de realizar un material de referencia para futuros estudios, por lo cual la especiación metálica fue exhaustiva con más de cinco laboratorios reconocidos, trabajando sobre las mismas muestras indicadas anteriormente. El uso de las técnicas directas, en el caso del jamón curado, fue directamente sobre la muestra sin ningún tratamiento previo, para los moluscos fue sobre el material liofilizado.

#### **3.1.1 Jamón curado**

##### **3.1.1.1 Selección de las muestras**

Se han tratado muestras de diferentes orígenes (España, Italia y Portugal), de diferentes tiempos de curado (03, 12, 14, 26, 30, 40, 18, 21, 22 meses) y de una misma parte del jamón (babilla), tal y como se especifica a continuación:

- 1) Muestra ibérica de Huelva con 3 meses de curado, referenciada como Huelva 03
- 2) Muestra ibérica de Huelva con 14 meses de curado, referenciada como Huelva 14
- 3) Muestra ibérica de Huelva con 26 meses de curado, referenciada como Huelva 26
- 4) Muestra ibérica de Huelva con 30 meses de curado, referenciada como Huelva 30
- 5) Muestra ibérica de Huelva con 40 meses de curado, referenciada como Huelva 40
- 6) Muestra ibérica de Sevilla con 18 meses de curado, referenciada como Sevilla 18
- 7) Muestra ibérica de Sevilla con 22 meses de curado, referenciada como Sevilla 22
- 8) Muestra ibérica de Ávila con 22 meses de curado, referenciada como Ávila 22
- 9) Muestra ibérica de Extremadura con 22 meses de curado, referenciada como Extremadura 22
- 10) Muestra ibérica de Badajoz con 21 meses de curado, referenciada como Badajoz 21
- 11) Muestra jamón curado de Portugal con 22 meses de curado, referenciada como Portugal 22
- 12) Muestra jamón curado Italiano de San Danielle con 12 meses de curado, referenciada como Danielle 12
- 13) Muestra jamón curado Italiano Parma con 12 meses de curado, referenciada como Parma 12

Se utilizaron también tres muestras Ibéricas de una misma pieza de jamón curado, pero de diferentes partes con el único propósito de identificar las diferencias entre ellas por HSI y elegir así la que presente diferenciación entre ellas, estas son:

- 14) La caña como la parte más pegada al hueso, referenciada como A1
- 15) La maza como la parte más prominente y lejana del hueso, referenciada como A2
- 16) La babilla que es como un intermedio de los tres, referenciada como A3 (ver figura completa de un jamón curado con sus diferentes partes en figura A, anexo VI).

#### **3.1.1.1 Metodología empleada para el estudio mediante ICP-MS**

Las muestras utilizadas para este estudio son las señaladas del 1 al 13. Para todas las muestras se realizaron las siguientes operaciones descritas a continuación, previo a la cuantificación por ICP-MS:

- *Liofilización:* tomamos alrededor de 5 gramos de cada jamón curado y lo liofilizamos en un equipo marca Telstar LyoQuest. Esta técnica es un método de desecación que no interfiere con las propiedades de nuestras muestras. El proceso empieza con la congelación del jamón con nitrógeno líquido y su posterior sublimación en condiciones de vacío, evitando así pasar por la fase líquida.
- *Homogenización:* Una vez liofilizada cada muestra, se tritura en un mortero de porcelana obteniendo un material homogéneo.
- *Pesada:* Para todas las muestras se pesa con exactitud un valor aproximado de 0.5000 gramos
- *Digestión ácida:* para evitar un fenómeno de sobrepresión, se realizó la digestión en el sistema DigiPREP® (figura B, anexo VI), donde una vez transferidos los 0.5000 gramos se realiza una primera fase de pre-digestión añadiendo a la muestra 4 ml de ácido nítrico concentrado y 1 ml de peróxido de hidrogeno (30%) y dejando reposar de 10 a 12 horas. Pasado este tiempo se colocan los tubos de digestión al equipo DigiPREP® con las siguientes etapas:
  - 1º : Una hora a una temperatura de 60 °C
  - 2º: Tres horas a una temperatura de 90 °C

Al finalizar el proceso todas las muestras estaban digeridas por completo.

- *Dilución:* Pasado el proceso de digestión y enfriamiento de las muestras, éstas se transfieren a frascos de polipropileno de 50 ml y se llevan a 25 g de peso con agua

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

*desionizada (Milli-Q). Las diluciones finales de las muestras se realizaron por volumetría, haciendo dos tipos de diluciones con el objetivo de analizar tanto los elementos que se encuentran en mayor proporción o en concentraciones de partes por millón (ppm) como los que se encuentran como metales traza o en concentraciones de partes por billón (ppb). Las diluciones realizadas se encuentran en la tabla A anexo VI.*

*Todos los reactivos utilizados, son reactivos de alta pureza 99.9% de la compañía Sigma-Aldrich y el material de referencia utilizado fue el RM 8414 (Bovine Muscle Powder) cuyo contenido esta descrito en la tabla B, anexo VI.*

*El equipo utilizado para el análisis de Espectroscopia de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) es de marca PerkinELmer ElanDRCII (figura C, anexo VI).*

*El método a seguir es el descrito según la Nor-031 para la determinación de metales por ICP-MS [3].*

*Los blancos de preparación se han realizado con la metodología de digestión utilizada pero en ausencia de muestra.*

*El orden de las determinaciones analíticas fue realizada en orden de diluciones para metales que se encuentran en concentraciones altas (metales mayoritarios) y para los que se encuentran a nivel de bajas concentraciones (metales trazas).*

*Todos los metales analizados son importantes para caracterizar las muestras, pero solo tomaremos aquellos que están asociados a los objetivos del presente trabajo: aquellos que puedan ser utilizados como biomarcadores o como elementos claves para la designación del origen. Metales como Fe, Zn, Cu, Sr y Cd fueron considerados para la interpretación posterior de nuestras muestras de jamón curado por diferentes motivos. Fe y Zn porque son los dos elementos que están involucrados en el proceso de curado y se ha descrito en varias publicaciones cómo estos afectan a la calidad del jamón curado [4- 6]. El Cu es un elemento relativamente abundante en la corteza terrestre y sus iones son moderadamente solubles, ocupando el puesto 26 en el ranking de abundancia en la corteza de la tierra detrás del Zn con una concentración media de 24 a 55 ppm. En el estado de oxidación +2 el cobre es isomorfo con los iones  $Zn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  y  $Fe^{+2}$  [7, 8]. El Sr es considerado para la relación isotópica de las muestras [referencia isotópica] como se indicará más adelante. Es un oligoelemento utilizado para señalar las diferencias naturales entre distintas localizaciones del suelo [9].*

Por último, el Cd se encuentra muy asociado al Zn en su geoquímica ya que ambos elementos tienen estructuras iónicas y electronegatividades similares, ambos presentan estructuras divalentes en todos sus compuestos estables, y ambos forman hidróxidos y complejos con iones de amonio y cianuro, así como una variedad de complejos orgánicos con aminas, sulfuros complejos, cloro-complejos y quelatos [10].

### **3.1.1.3 Metodología empleada para el estudio por dilución isotópica**

La determinación de la composición isotópica de un elemento, puede aplicarse, como ya se comentó, al análisis de especiación. En nuestro caso, no se ha realizado esta posibilidad, sino que al tener muestras de diferentes orígenes, se ha realizado una asociación de los isótopos de Sr con el origen de nuestras muestras. Las relaciones isotópicas del elemento de Sr en jamón proporcionan un medio por el cual las regiones con características geológicas similares o idénticas pueden ser identificadas. La determinación de isótopos de  $^{87/86}\text{Sr}$ , es considerada como adecuada para estudiar la autenticidad y la asignación de orígenes de la gran mayoría de los alimentos [11].

El Sr pertenece al grupo II A de los elementos de la tabla periódica, es un metal alcalinotérreo y se puede encontrar de forma natural en forma de los isótopos:  $^{84}\text{Sr}$ ,  $^{86}\text{Sr}$ ,  $^{87}\text{Sr}$  y  $^{88}\text{Sr}$ . [12] Para el análisis de los isótopos estables se emplean técnicas de espectrometría de masas, siendo el acoplamiento de MC-ICP-MS de alta resolución (multicollector detector) la técnica preferida en la mayoría de los estudios [13] en nuestro caso se utilizó el equipo que se describe a continuación.

El equipo utilizado para la determinación isotópica fue un multi-colector acoplado a un ICP-MS (MC-ICP-MS) de marca Nu-Instruments, Wrexham, UK (figura C, anexo VI). Las correcciones de interferencia, exactitud y precisión fueron controladas con un material de referencia estándar (SRM 987; [www.nist.gov/SRM](http://www.nist.gov/SRM)). El valor de la desviación estándar significa el valor de  $^{87}\text{Sr} / ^{86}\text{Sr}$  en SRM 987 ( $n = 40$ ) que se obtiene a través de los análisis  $^{87/86}\text{Sr} = 0,71034 \pm 0,00003$ .

La metodología de análisis es la siguiente:

Introducción de las muestras: canal Cinnabar Spray más 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  micro-concentric neb auto-muestra.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Cones: tipo Nikel A (plasma húmedo), RF polvo (W):1300, Block: 3, ciclo: 20, tiempo integración: 20 segundos, tiempo adquisición: 600 segundos, Corrección de masas bias:  $^{87/86}\text{Sr}$  ratio constante=0.1194.

La separación de los isotopos de  $^{87/86}\text{Sr}$  de la matriz obtenida por mineralización se realizó mediante el método de extracción al vacío de columnas de resinas específicas para este elemento de la marca Sr-Eichrom, se realizaron 3 ciclos completos de separación incluyendo la limpieza de las columnas, las 13 muestras descritas anteriormente se separaron en un total de 12 columnas durante 8 horas (figura D, anexo VI).

#### **3.1.1.4 Metodología empleada para el estudio de imágenes hiperespectrales**

El objetivo de este estudio, fue utilizar la herramienta HSI en conjunto con análisis multivariante para clasificar las muestras de jamones curados de dos orígenes diferentes (Ibérico e Italiano) utilizando la región del infrarrojo cercano (NIR), comprendido en las longitudes de onda de 880 nm a 1720 nm, siguiendo los siguientes pasos:

- ✓ Se ha trabajado tanto con las imágenes obtenidas como los espectros obtenidos dentro del rango señalado.
- ✓ Se realizó una normalización y eliminación de bandas de ruido.
- ✓ Se identificó la parte o área de estudio del jamón curado, donde se podía obtener la mejor información posible para hacer la clasificación.
- ✓ Se utilizó un análisis de componentes principales, para identificar las longitudes de onda que tienen mayor relevancia en la formación de las PCs
- ✓ Se realizó un análisis discriminante en la construcción de nuestro modelo y se comprobó su eficiencia, con variables independientes al modelo construido.

#### Preparación de las muestras

Al ser una técnica directa, no fue necesario hacer un tratamiento previo de nuestras muestras.

Se analizaron un total de siete muestras diferentes del jamón Ibérico y cuatro muestras diferentes del jamón italiano, se realizaron cortes con un cuchillo de cerámica de 3 x3 cm y de 0,5 cm de espesor, de cada zona de las muestras del jamón curado, se han hecho 5 cortes de cada muestra lo que significa que para una hay 5 imágenes medidas. Se tuvo el cuidado, al hacer los cortes, de no abarcar grandes superficies de grasa para que nuestro estudio no se vea afectado por interferencias de la matriz.



*El orden e identificación de nuestras muestras para este estudio, es el siguiente:*

- Jamón 100% Ibérico (raza sin mezcla) de la parte de la caña. Referenciada como A1.*
- Jamón 100% Ibérico (raza sin mezcla) de la parte de la Babilla. Referenciada como A2.*
- Jamón 100% Ibérico (raza sin mezcla) de la parte de la Maza. Referenciada como A3*
- Jamón 75% Ibérico (raza mezclada con un 25% de cruce Duroc) con 3 años de curación. Referenciada como B1.*
- Jamón 75% Ibérico (raza mezclada con un 25% de cruce Duroc) con 26 meses de curación. Referenciada como B2.*
- Jamón 100% Ibérico (raza sin mezcla) con 2 años de curación. Referenciada como B3.*
- Jamón 100% Ibérico (raza sin mezcla) con 22 meses de curación. Referenciada como B4.*
- Jamón Italiano Prosciutto di San Daniele, con 18 meses de curación. Referenciada como C1.*
- Jamón Italiano Prosciutto di San Daniele, con 22 meses de curación. Referenciada como C2.*
- Jamón Italiano Prosciutto di Parma, con 22 meses de curación. Referenciada como C3.*
- Jamón Italiano Prosciutto di Parma, con 30 meses de curación. Referenciada como C4.*

#### *Adquisición de imágenes hiperespectrales en la región del infrarrojo cercano*

*Las imágenes HSI en NIR, fueron adquiridas en el laboratorio de caracterización de partículas sólidas, del departamento de ingeniería química, materiales y medioambiente, de la Universidad de Roma la Sapienza, Campus de Latina, Italia.*

*El diseño de adquisición está basado, en el configurado por el equipo a modo pushbroom, la plataforma o cinta transportadora es de 26 cm de ancho y 160 cm de largo, ajustable su velocidad de 0 a 50 mm/s y el sistema configurado en el infrarrojo cercano (Near InfraRed, NIR) y una cámara espectral modelo ImSpector N17E<sup>TM</sup>.*

*La resolución de la imagen, en el rango de 880 a 1720 nm es de 7 nm, haciendo la adquisición de reflectancia a un total de 121 longitudes de onda en el rango indicado. El espectrómetro se acopló a una lente de 15 mm. Las imágenes se analizan en línea, su ancho es de 320 píxeles por 12 bits, la óptica está basada en un sistema de Prism-Grating-Prism, que tiene una alta eficiencia de difracción. La longitud de onda central pasa por la parte central del sistema, mientras que las próximas son difractadas. La disposición de espectrómetro, en línea con la muestra, permite la medida de las dimensiones geométricas.*

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La calibración de la imagen se llevó a cabo por medio de imágenes de referencias en blanco y negro. La imagen negra (B) fue adquirida para eliminar el efecto de la corriente oscura del sensor de la cámara, (haciendo apagar la fuente de luz cubriendo el lente de la cámara con su tapa) la imagen de referencia blanca (W) fue adquirida con una baldosa de cerámica blanca estándar. Luego se aplica la siguiente ecuación para la corrección de la imagen:

$$I = \frac{I_0 - B}{W - B} \times 100$$

Dónde:

*I* es la imagen espectral corregida en unidad de reflectancia relativa (%)

*I*<sub>0</sub> es la imagen espectral original

*B* es la imagen de referencia negro (~ 0% de reflectancia)

*W* es la imagen de referencia blanco (~ 99,9% de reflectancia)

La figura F, anexo AAA muestra el equipo HSI usado para nuestras mediciones.

#### Tratamiento de las imágenes adquiridas

El análisis hiperespectral se basa en la capacidad del equipo descrito anteriormente, para adquirir imágenes digitales en una gran cantidad de canales espectrales muy cercanos entre sí, obteniendo, para cada pixel, una firma espectral característica de cada material [15]. Este proceso facilita la identificación y cuantificación de los materiales que se analizan [16]. El potencial de estas imágenes es la gran cantidad de información que permite distinguir clases de manera más detallada, esta es una gran ventaja que puede convertirse en desventaja si no se dispone de las herramientas necesarias y útiles de gran capacidad que puedan analizar esta gran cantidad de información. Por lo que nos enfrentamos entonces a los problemas de alta dimensionalidad de datos. Solo para hacernos una idea del tamaño total de una imagen de este tipo, ha de multiplicar el tamaño del pixel en bits, por el tamaño de una imagen o banda individual y por el número de bandas totales. La redundancia de la información, es decir, la repetición de muchos patrones espectrales, puede llegar a ser bastante significativa, resultando en muchos casos un inconveniente cuando se quieren utilizar métodos estadísticos de clasificación. Por tanto, se hace necesario realizar técnicas de procesamiento que incluyen tanto hardware como software

capaces de gestionar la complejidad intrínseca de los datos hiperespectrales de manera efectiva [17]. Por ello hemos introducido una serie de pasos para el procesamiento de estos datos como sigue:

- ✓ Selección de las zonas de interés o ROI, de las muestras, esto significa que una vez se haya adquirido la imagen hacemos una selección de las regiones de interés, lo que se obtiene haciendo un tratamiento previo de la imagen de clasificación. (se describe más adelante bajo el epígrafe: segmentación de la imagen).
- ✓ La información adquirida en la ROI es transformada en espectros con longitudes de ondas discretas, que posteriormente son normalizados y centradas por medio de la subestación de señales de ruido y del uso de algoritmos matemáticos que se describen más adelante.
- ✓ Una vez que los datos de interés han sido pre-procesados, Se lleva a cabo el tratamiento de los mismos para extraer la información relevante, para lo que utilizaremos el software adecuado que describimos más adelante.

#### Selección de las regiones de interés (del inglés, regions of interest, ROI)

La ROI, es el espacio físico de la muestra de jamón (9,75 x 6,34 mm) que se selecciona aleatoriamente, dando como resultado un espectro promedio de los espectros de cada pixel de la ROI, promediando así las absorbancias para cada longitud de onda.

por el software SScanner 1.4.5, que puede tener unas dimensión de 1,22 x 0,79 mm, 2,44 x 1,58 mm, 4,88 x 3,17 mm, 9,75 x 6,34 mm, en nuestro caso, se ha utilizado las dimensiones de 9,75 x 6,34mm, obteniendo una ROI igual al promedio de 17 columnas (longitudes de onda) por 17 filas (valores espectrales). Figura E, anexo VI.

Con el objetivo de descartar la posibilidad de variabilidad de la muestra, previamente a la selección de las ROI, se realizó una comparación de los valores espectrales de ROI de trozos (cortes) de jamón curado de una misma muestra tomadas de la parte babilla del jamón curado. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas entre los trozos por lo que procedimos a seleccionar las ROI de nuestro estudio a partir de cinco trozos de babilla del jamón curado.

Luego se procede a realizar un algoritmo de clasificación de imágenes hiperespectrales, donde cada imagen se segmenta de acuerdo a las zonas reconocidas por el software ENVI.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### Segmentación de la imagen

Para este estudio hemos utilizado la clasificación no supervisada (IsoData Classification) del software ENVI 5.0 (©2012 Exelis Visual Information Solution, Inc) como herramienta de visualización, el tratamiento de la imagen se inició mediante la transformación de la imagen NIR en una imagen de color RGB falso (del inglés, Red-Green-Blue, RGB), la imagen RGB se genera al tomar los canales espectrales de 1447 nm para el canal rojo; 1181 nm para el canal verde; y 971 nm para el canal azul [18-20]. La asignación de estas longitudes de onda como canales de color RGB, es debido a que estas longitudes de onda se identifican máximas de absorbanza. Figura F, anexo VI

La reconstrucción de la imagen RGB se realiza por medio de una segmentación o agrupamiento de píxeles con propiedades similares, los cuales podrían representar las diferentes zonas o compuestos presentes en la imagen.

Cada imagen procesada se diferenció zonas de baja y alta reflectancia, las cuales fueron reconocidas con el color verde y rojo, respectivamente. Como se mostró anteriormente en la figura 6 del epígrafe 1.2.1.7.1, (todas las imágenes se muestran en la figura G, anexo VI), para cada corte, se seleccionaron 5 ROI de 9,75 x 6,34mm, y los espectros NIR de todas las ROI se promediaron para cada región. Ambos tipos de jamón, españoles e italianos, fueron tratados de la misma manera.

Esta clasificación no supervisada (IsoData Classification) se realiza interactivamente (≈100 iteraciones) hasta que se han probado todos los píxeles de la imagen dando como resultado la segmentación de la imagen en clases diferenciadas por zonas de baja y alta reflectancia de la imagen del jamón reconstruida.

#### Análisis espectral de los datos

Como se ha comentado, la región NIR de los espectros fue analizada usando el programa Unscrambler, versión 10.3 (CAMO, Norway). Para trabajar bajo el concepto de absorbanza hemos convertido los datos obtenidos en reflectancia en datos de absorbanza aparente mediante la fórmula:

$$A = \log_{10} \left( \frac{1}{R} \right)$$

*Un ejemplo de un espectro antes y después de la aplicación de los algoritmos de trabajo se mostró en la figura 5, capítulo 1.*

*Para futuros procesamientos hemos reducido los datos espectrales al rango de longitudes de onda de 901 a 1375 nm, seleccionando unas 68 bandas (longitudes de onda), esta limitación en el número de datos es debida a que se observa una saturación del equipo en algunas muestras italianas y a un mejor acondicionamiento de los espectros.*

*Para minimizar le efectos de dispersión, se ha usado el algoritmo standar normal variate (SNV), el SNV, Se aplica a cada espectro individual, calculando la media y la desviación estándar de todos los puntos de datos para cada espectro, el valor promedio se resta de la absorbancia para cada punto de datos y el resultado se divide por la desviación estándar, obteniendo así espectros centrados y escalados, (figura 5, capítulo 1).*

#### *Análisis Preliminar de los datos normalizados*

*El hecho de utilizar técnicas de pre-procesado va orientado a la reducción de la dimensionalidad de los datos de entrada, esta reducción se plantea para reducir la carga computacional de pasos sucesivos y poder diferenciar mejor las interacciones entre variables y las variables con mayor peso. Tiene como objetivo reducir el número de bandas y que, al mismo tiempo, proporcione una imagen representativa con toda la información indispensable para realizar el análisis sobre este conjunto de nuevas variables que reducen la dimensionalidad de datos originales [21].*

*Es importante distinguir las técnicas de reducción dimensional de las técnicas de compresión de imágenes hiperespectrales [22], cuyo objetivo es la simplificación dimensional que no permite, por regla general, reconstruir la imagen original.*

*No obstante, al hacer una reducción dimensional no perdemos la información ya que realizamos el análisis sobre un sub-conjunto reducido de toda la imagen original. De este modo, los algoritmos de reducción dimensional suelen estar diseñados de forma que minimizan los errores cometidos al trabajar con dicho subconjunto. [23].*

*El método de reducción dimensional que hemos utilizado, es el análisis de componentes principales, descrito a continuación.*

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### Análisis mediante componentes principales (PCA)

*La complejidad y cantidad de los espectros NIR requiere el uso de procedimientos de quimiometría para extraer y visualizar la información analítica útil. El Análisis de Componentes Principales (PCA) es a menudo el primer paso para el análisis de datos con el fin de detectar patrones en los datos medidos. El método de PCA aprovecha la elevada correlación existente entre bandas consecutivas de una imagen hiperespectral [24].*

*La transformación PCA permite obtener un conjunto reducido de bandas (denominadas auto vectores) poco correlacionadas entre sí, (ortogonales, en el caso ideal) que contienen la mayor parte de la información presente en la imagen original. Así, el primer auto vector contiene el mayor porcentaje de la varianza de la imagen original; el segundo contiene mayor porcentaje de varianza que el tercero, y así sucesivamente.*

*PCA se realizó con diferentes objetivos.*

*En una primera etapa, para estudiar las diferencias que pueden existir entre varias partes del jamón, muestras A1-A3 de jamón ibérico, y en una segunda etapa con el resto de las muestras (B1 a C4) para la clasificación entre ellas.*

*Al igual que con todos los métodos no supervisados para la clasificación (explicados anteriormente), el análisis de PCA, explica y muestra los patrones de las muestras estudiadas, pero no la clasificación de nuevas muestras (asignación a una clase determinada), ya que el método no hace o no calcula una regla para generar fronteras o regiones para los grupos de muestras obtenidas. Por lo tanto, un método supervisado fue aplicado con el fin de conseguir resultados de clasificación.*

#### Análisis parcial discriminante de los mínimos cuadrados parciales (PLS-DA)

*La metodología para construir el modelo PLS-DA, fue el siguiente: de cada ROI principal con dimensiones de 9,75 x 6,34 mm, se obtuvieron 5 ROIs secundarias de 1,22 x 0,79 mm y por consiguiente, 5 espectros promedios de estas zonas de interés, de los cuales cuatro espectros fueron utilizados para construir el conjunto de calibración, y uno fue utilizado para construir el conjunto de predicción.*

*Las variables categóricas fueron asignadas a las muestras del conjunto de calibración de la siguiente manera: el número 1 al jamón ibérico y el número 2 para el jamón italiano, los criterios para considerar que una muestra está correctamente clasificada se han indicado en la sección 1.2.3.2. Los resultados, después de la construcción de este modelo de PLS-DA, se recogen en el siguiente capítulo y en el anexo II.*

#### **3.1.1.5 Metodología empleada para el estudio mediante la técnica Sincrotrón**

*En este estudio, utilizamos las técnicas de absorción de luz sincrotrón con el objeto de identificar las formas químicas moleculares del Fe y el Zn (especiación) asociadas a aspectos estructurales y electrónicos en los sistemas en que se encuentran estos elementos (referencias moleculares de Fe y Zn y muestras de jamón)*

*Nuestro método de estudio de estos sistemas consistió en el empleo de la técnica de Absorción de Rayos X Cercana al Borde de Absorción (XANES), realizando tanto experimentos como tratamiento estadístico de los espectros. Dichas metodologías nos permitieron revelar las propiedades estructurales y electrónicas de diferentes estados de oxidación del Fe y la naturaleza orgánica e inorgánica del Zn, obteniendo un cúmulo de información únicamente accesible por esta técnica gracias a su selectividad química y su apropiada sensibilidad al entorno atómico local del átomo absorbente. Nuestra contribución original consistió en el aprovechamiento y la adaptación de la espectroscopia XANES para el seguimiento in situ del proceso de curación del jamón y de las transformaciones ocurridas durante dicha curación, estableciendo correlaciones fundamentales entre las características electrónicas y estructurales de diferentes referencias moleculares con el sistema que pueda haberse generado en el jamón curado.*

#### *Preparación de las muestras de jamón para el análisis*

*Después que las muestras fueron caracterizadas por medio del análisis del ICP-MS, con el objetivo de conocer su concentración metálica, se preparan muestras de jamón en forma de cuadraditos de 1x1x1 cm de jamón Ibérico, cada muestra se cubrió con cinta kapton (transparente a los rayos X). Las muestras analizadas por sincrotrón son las Huelva 03, Huelva 14 Huelva 26 y Huelva 40.*

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para cada muestra, la zona de estudio es la babilla, la cual se ha dividido en dos partes, con la finalidad de observar posibles diferencias entre ellas, una es la parte externa o superficial de esta parte del musculo, identificada en este estudio como "ma" y otra parte más interna o profunda, identificada como "mb". Cada medida fue por duplicado y se presenta el promedio de ellas.

Para cada muestra todas las Referencias fueron obtenidas de la compañía Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), las cuales son:

- A) Para el Fe: 5, 10, 15, 20-Tetrakis (pentafluorofenil) -21H, 23H- cloruro de porfirina de hierro (III), citocromo C (III), mioglobina de caballo (III), hematin (II), cloruro de hierro (III), sulfato de hierro amoniacal (II), hemin (III), hemoglobina porcina (II), óxido de hierro (II), goethita (III), hematita (III), magnetita (II/III).
- B) Para el Zn: cloruro de zinc, sulfato de zinc, 5, 10, 15, 20-Tetrafenil-21H, 23H-porfirina de zinc, protoporfirina de zinc IX, zinc metálico, metaloproteína de zinc.

#### Experimento XAS

La toma de datos en la espectroscopia XAS se realiza habitualmente de dos maneras distintas: en modo transmisión o en modo fluorescencia.

Debido a que la concentración tanto para el Fe como para el Zn en nuestra muestra es inferior al rango en el cual se pueda medir estos elementos por transmitancia (>50 ppm) la opción de medida fue la de fluorescencia. En el caso de las referencias todas se han medido por transmitancia ya que previamente se había calculado la concentración necesaria para obtener una señal cuantificable en el K-edge. La preparación de las mismas consistió en hacer unas tabletas prensadas con dimensiones de 5 x 20 mm de una mezcla de celulosa y material molturado de cada referencia para evitar cualquier error o señal de ruido en nuestras medidas. El montaje de las muestras en la línea experimental XAS puede verse en la Figura 13. La energía de rayos X es seleccionada por un monocromador, siendo que la reflexión del mismo se elige en función del rango de energía a ser estudiada en el caso del Fe es 7112 eV y en el caso del Zn 9659 eV y de la resolución experimental deseada. La resolución en energía  $\Delta E/E$  es mejor para las reflexiones con índices de Miller más altos, aun cuando la intensidad resultante sea más débil [25].



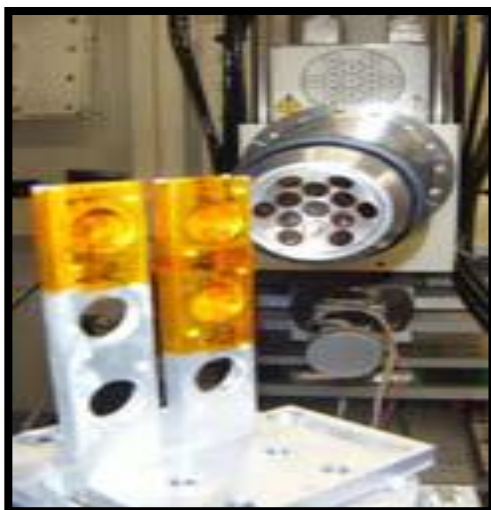


Figura 13. Muestras de jamón cubiertas con cinta Kapton y en frente el detector de la línea XAS.

Adquisición de los datos. Técnica XANES.

Los espectros XANES en los bordes K-Fe (7112 eV) y K-Zn (9659 eV) se midieron a temperatura ambiente en el modo de transmisión y fluorescencia usando un monocromador de Si (111) con una apertura de rendijas de 0.3 mm en la línea BALDER del sincrotrón MAX-LAB, con un rango de energía de 2.4-40 Kev.

La señal XANES se extrajo de los espectros de absorción de rayos X usando el programa Xanes Dactyloscope (15/02/2013 ©K.Klementiev, Alba-CELLS) y algunas figuras con el programa Athenas (Demeter 0.9.13©Bruce Ravel). La adquisición de datos (espectros) fue hecha por medio de un barrido continuo de 7045,75 a 7175,75 para el hierro y de 9595,76 a 9725,76 para el zinc, (alrededor de 60 eV antes del borde y más de 60 eV después del borde), con un tiempo de 10 segundos por cada punto de adquisición (alrededor de 130 puntos).

La normalización se hizo sustrayendo un fondo lineal en la región del pre-borde y un polinomio cuadrático para la región posterior al borde. Como criterio de normalización se fijó un salto de 1 en la absorción a una energía, donde el espectro no presenta estructura fina (oscilaciones más suaves en la absorción), la cual posee información precisa sobre la estructura atómica local alrededor del átomo absorbente.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

*El análisis de datos fue realizado sustrayendo el fondo en el pre-borde y reescalando la absorbancia por la normalización entre la línea de base y una región a aproximadamente 100 eV después del borde de absorción.*

*El espectro XANES otorga información física y química del entorno local de un elemento involucra dispersiones y transiciones a estados desocupados, siendo una herramienta rica en informaciones cristaloquímicas del átomo absorbente, como es el estado de oxidación, que posteriormente se compara con los espectros conocidos de las referencias moleculares utilizadas haciendo que el espectro XANES se considere como una impresión digital de la estructura tridimensional local.*

#### Análisis de datos

*Para hacer una correcta interpretación de los datos, resumiremos algunas características de la zona XANES.*

#### *Región de Pre-Borde (Posición e Intensidad de las Transiciones Electrónicas)*

*Esto quiere decir, que antes de tratar de hacer un ajuste linear o algún otro tratamiento matemático con nuestros espectros debemos observar esta parte, que nos da una orientación de parecido entre los espectros obtenidos [25, 26].*

#### Posición en energía del Borde de Absorción

*El salto de energía en esta posición está afectado por la resolución (intrínseca y experimental), y no siempre puede realizarse una asignación sencilla [27], este salto de absorción por encima de la energía  $E_0$  (energía umbral de ionización) se denominan picos de resonancia, que pueden ser descritos mediante dos modelos:*

- a) Un electrón eyectado es atrapado por una barrera de potencial, de la cual puede emerger hacia el continuo por efecto túnel.*
- b) Las formas de resonancia se deben a la presencia de orbitales moleculares desocupados embebidos en el continuo.[28]*

*Ambos enfoques son complementarios y dan una descripción adecuada del fenómeno ocurrido en el borde de absorción.*

### Análisis mediante componentes principales (PCA) y Target Transformation (TT)

Debido a que las similitudes en los espectros de referencia no son fácilmente identificables y para realizar un pretratamiento sistemático de los datos espectrales reduciendo su dimensionalidad, hemos realizado un análisis mediante PCA y/o TT para determinar el número mínimo de componentes significativos de espectros de referencia que se requeriría para generar una matriz comparable a los espectros de las muestras [29].

La TT está contenida en el análisis de PCA, dependiendo si se excluye o se incluye la muestra analizada nos da una TT o PCA respectivamente, para ambos análisis se utilizó la región espectral XANES, que luego nos serviría para relacionar los espectros de las muestras con los espectros de las referencias en el ajuste de combinación lineal.

En el análisis de los componentes principales en el conjunto total de los espectros XANES, excluyendo los compuestos de referencia óxido de hierro (II), goethita (III), hematita (III), magnetita (II/III), indica que sólo existen tres componentes principales. Así, es posible reproducir, dentro del acuerdo fijado por el método de análisis, la totalidad de los espectros XANES por la superposición de sólo tres espectros (componentes abstractas). El resto de las componentes obtenidas están por debajo del nivel del ruido experimental.

Mediante el análisis TT es posible determinar si el espectro XANES de una muestra analizada puede ser reproducido por la combinación de los espectros de las referencias moleculares seleccionadas para el análisis, en el caso de poder reproducirlo, es posible afirmar entonces que los sitios de este compuesto (todos ellos) están presentes en el conjunto de datos analizados.

Esto se puede visualizarse a través de los componentes resultantes, lo que significa, que según el número resultante de componentes principales serán más o menos los diferentes entornos químicos diferenciables alrededor del átomo de estudio. Que según los resultados solamente se pudo distinguir cuatro y tres entornos químicos diferenciables para el Fe y Zn respectivamente.

### Análisis mediante el ajuste de combinación lineal (LCF)

El hecho de se haya identificado estos componentes principales, nos ayuda a realizar un ajuste lineal entre las referencias y las muestra, en un rango de -20 eV y +30 eV del borde

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

espectral de cada elemento. Los parámetros estadísticos del ajuste R-factor y  $\chi^2$  proporcionan información de la incertidumbre del ajuste

La tabla 1 muestra las referencias usadas en el ajuste de combinación lineal, eligiéndose posteriormente la mejor combinación resultante (es aquella que posee el menor R-factor y  $\chi^2$ ).

No se consideró las referencias cuyo porcentaje de influencia en las muestras era menor a 5%.

ID	Referencias moleculares para el Hierro	Referencias moleculares para el Zinc
1	Cloruro de hierro (III)	Cloruro de zinc
2	Sulfato de hierro amoniacal (II)	Protoporfirina de zinc
3	Mioglobina(III)	Sulfato de zinc
4	Hemin (III)	

Tabla 1. Referencias de usadas para LCF y la asignación de número de identificación.

### 3.1.2 Moluscos

#### 3.1.2.1 Selección de las muestras.

Cada muestra consistió en 50 Kg (ostras) y 20 Kg (mejillón) con tamaño similar (75 a 100 mm), que no tuvieran anormalidades en sus tejidos blandos, después del muestreo, los moluscos vivos fueron transportados al laboratorio que iba a realizar el proceso de liofilización, que consistió en un primer paso en congelarlos alrededor de 72 horas a  $-49^{\circ}\text{C}$ . Pasado ese tiempo se dejó descongelar y se retiró el molusco, descartando la concha. La liofilización se llevó a cabo en dos partidas obteniendo reducción de 5 a 7 veces de su peso, después liofilizado.

La pulverización y homogenización del material liofilizado estuvo a cargo del laboratorio especializado IPREM (centro gestor del proyecto ORQUE SUDOE), que básicamente consistió en pulverizar las muestras y luego colocarlas en una mezcladora durante 24 horas antes de ser envasadas en frascos oscuros y ser distribuidas a los diferentes laboratorios que participaron en los análisis de las muestras, el nuestro entre ellos y que forman parte del proyecto ORQUE SUDOE.

Una vez obtenido este material liofilizado de las distintas muestras de moluscos procesadas, se desarrollaron las siguientes tareas con dicho material:

- ✓ Ser utilizado para caracterizar las muestras mediante análisis elemental por la técnica de ICP-MS y llevar a cabo un análisis de comparación interlaboratorios.
- ✓ Realizar especiación química de As y Zn mediante la técnica de sincrotrón.
- ✓ Contribuir al proceso de creación de un nuevo material de referencia para futuros análisis.

La muestra de nuestra contribución al proyecto fueron los mejillones provenientes del Delta del Ebro, sin embargo analizamos todas las demás muestras con el objetivo de conocer sus concentraciones metálicas antes de ser analizadas mediante la técnica del sincrotrón y participar en el estudio interlaboratorio del proyecto.

Los metales analizados fueron seleccionados por su relación con el control de la toxicidad de productos alimentarios y por su posible relación con la actividad antropogénica. Para el

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

*caso de los estudios con las técnicas de sincrotrón, los elementos seleccionados debían tener una concentración adecuada para su detección por la técnica.*

*Estos elementos son: arsénico, selenio, zinc, cromo, cobre, níquel, plomo.*

*No obstante y dada la limitación del acceso, al tiempo de luz en el sincrotrón solo se pudo analizar por esta técnica los elementos arsénico y zinc, y 4 muestras del total de 10, y cuyos, resultados que se discuten más adelante.*

*Las muestras fueron obtenidas de diferentes puntos de muestreo descritos a continuación:*

- 1. Ostras cultivadas de la Bahía de Arcachon, Francia. Referenciada como Arcachón O-C.*
- 2. Ostras silvestres de la Bahía de Arcachon, Francia. Referenciada como Arcachón O-S.*
- 3. Mejillones silvestres de la Bahía de Arcachon, Francia. Referenciada como Arcachón M-S.*
- 4. Ostras cultivadas de la costa La Rochelle, Francia. Referenciada como La Rochelle O-C.*
- 5. Ostras silvestres de la costa La Rochelle, Francia. Referenciada como La Rochelle O-S.*
- 6. Ostras cultivadas de la costa de Ostranor, País Vasco, España. Referenciada como Ostranor O-S.*
- 7. Ostras silvestres de la costa Urdaibai, Bilbao, España. Referenciada como Urdaibai O-S.*
- 8. Ostras silvestres de la costa de Sado, Portugal. Referenciada como Sado O-S.*
- 9. Mejillones cultivados del delta de Ebro, Tarragona, España. Referenciada como Ebro M-C.*
- 10. Ostras cultivadas de la costa de Aveiro, Portugal. Referenciada como Aveiro O-C.*

*Cada una de estas muestras, fueron procesadas por los integrantes del proyecto en cada punto de muestreo correspondiente, siguiendo el mismo protocolo de recolección, limpieza y preparación de las muestras como se describe en el protocolo de recepción descrito en el anexo VII, únicamente el procesamiento de la muestra 9, estuvo a nuestro cargo, todas las muestras se encuentran referenciadas en el texto con el número correspondiente a su orden.*

#### Procesamiento de la muestra número 9 (mejillones cultivados del Delta del Ebro)

El objetivo primordial de este paso, al igual que el resto de muestras del estudio, es obtener nuestras muestras de mejillones liofilizada y libre de contaminación metálica externa, y de esta forma, trabajar sincronizados con los diferentes laboratorios participantes. Debido al volumen de la muestra de mejillones, todo el procedimiento desde la recepción a la liofilización de la misma estuvo a cargo de una empresa externa especialista en procesamiento de muestras alimentarias realizó los siguientes pasos:

- 1- Recepción de 10 kg de mejillones refrigerados, donados por la federación de productores de moluscos del Delta del Ebro (FEPROMODEL) Tarragona. La hoja de datos de control está en anexo VIII.
- 2- Posterior congelación a -18 C durante 24 horas en bandejas (HDPE), tapadas con Film, y aislado de la luz.
- 3- Pasado este periodo, se realiza la descongelación no forzada a temperatura ambiente durante 6 horas, para extraer los mejillones manualmente.
- 4- Después de su extracción, se filtran para eliminar el exceso de agua, quedando un peso total de 1640 gramos de mejillones sin cascara (material húmedo)
- 5- Se colocan en vasos de polipropileno (PP) desechables para repetir el proceso de congelación y posteriormente liofilizarlos.

La liofilización se llevó a cabo en un liofilizador Telstar Lyoquest® obtenido como resultado final 355 gramos de mejillón liofilizado. Esto se nos entregó en dos bolsas de 200 y 155 gramos respectivamente, al 100% de vacío sin ningún gas conservante, ver anexo VII.

Estas muestras fueron entregadas a los coordinadores del proyecto, especializados en homogenización de muestras, en el parque tecnológico Technopole Hélioparc en Pau, Francia. Posteriormente fueron envasadas y etiquetadas en botellas de cristal ámbar (aproximadamente 35 gramos de mejillón liofilizado) para su distribución a todos los laboratorios participantes, ver foto de las muestras en la figura H, anexo VI.

Todas las muestras fueron tratadas por igual y analizadas por triplicado (se reporta el promedio de las medidas), al mismo tiempo que 8 laboratorios más realizaban sus análisis por separado para luego ser intercomparados.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.1.2.2 Metodología empleada para el estudio mediante ICP-MS

*Para el análisis de los metales de interés (arsénico, selenio, zinc, cromo, cobre, níquel y plomo) de la investigación se realizó una pre-digestión de todas las muestras liofilizadas, colocando un tubo 0.500 ± 0.003 gramos de la muestra liofilizada (triturada y homogenizada) con 4 ml de ácido nítrico concentrado (≥65%) y dejándola en reposo durante 12 horas. Finalizando este proceso, se añade 2 ml de peróxido de hidrogeno al 30 %, se tapa y se coloca en un baño de arena a 50 °C la primera hora, aumentando luego la temperatura a 90 °C por un periodo de tres horas. Pasado este tiempo se obtuvo una solución transparente completamente digerida.*

*Tras el proceso de digestión se dejaron enfriar las muestras aforando a 50 ml con agua desionizada (Milli-Q). Se prepararon los blancos correspondientes y un material de referencia estándar Bureau Communautaire de Reference, BCR 710 (ver información en anexo IX) con los mismos procedimientos para controlar la exactitud y precisión.*

*Los niveles de arsénico, selenio, zinc, cadmio, cromo, cobre, níquel y plomo fueron determinados en las muestras digeridas mediante el ICP-MS modelo ELAN 6000 (Thermo) con la misma metodología utilizada por Barata y colaboradores., [30] en las instalaciones del grupo de investigación GTS química analítica de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los blancos fueron analizados por cada 9 muestras para controlar el efecto memoria del equipo. Los límites de detección y cuantificación (L.D y L.C) se calcularon a partir de las mediciones de los blancos.*

*Los metales analizados se encuentran por encima del límite de detección de nuestro equipo empleado. Como ya se había mencionado antes, solo las concentraciones de As, Zn y Cu pudieron ser estimadas para su lectura en el sincrotrón, obteniendo resultados solo de los metales As y Zn en únicamente 4 muestras del estudio.*

*Estudio interlaboratorio en el proyecto ORQUE-SUDOE: Los laboratorios participantes y las técnicas empleadas fueron los siguientes:*

- 1- Université de Pau et des Pays de l'Adour Faculté des sciences Equipe (LCABIE-IPREM) con la técnica Id GC- ICP-MS.*



- 2- *Universidad Complutense de Madrid (UCM) con la técnica de ICP-MS y para la especiación de As la técnica de LC-ICP-MS.*
- 3- *Universidad de Aveiro, Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) con la técnica de ICP-MS.*
- 4- *Universite de Bordeaux , (LPTC) con la técnica de LC/MS/MS*
- 5- *Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, con la técnica de ICP-MS.*
- 6- *Universidad Autónoma de Barcelona, Centro GTS, con la técnica del sincrotrón.*
- 7- *ADERA UT2A con la técnica ICP-MS y para la especiación de As la técnica ICP-AES y HPLC-ICP-MS*
- 8- *Ministério da Saúde Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge Departamento de Alimentação e Nutrição (INSA) con la técnica de ICP-MS.*
- 9- *Universite de la Rochelle Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), con la técnica de ICP-AMA.*

*Todos los participantes contribuyeron con la determinación de los metales utilizando la técnicas asignada para ellos, en esta parte solo está el reporte de 8 participantes ya que la participación del equipo de LCABIE-IPREM, fue solo considerada para llevar a cabo la especiación de mercurio.*

*Siguiendo los protocolos de intercomparación de laboratorios, los resultados obtenidos se presentarán de manera confidencial asignando una letra a cada laboratorio.*

#### **3.1.2.3 Metodología empleada para el estudio mediante la técnica de sincrotrón**

*El estudio de biomarcadores se basa en que la interacción de algunos elementos con los organismos se desarrolla a nivel molecular y celular y por tanto, las respuestas a estos niveles representan medidas sensibles e indicativas de posibles efectos a nivel individual [31, 32]. Razón por la que los niveles inferiores de organización se convierten en los más apropiados para el estudio de las relaciones causa-efecto y de los mecanismos de acción de los elementos seleccionados.*

*La caracterización de muestras marinas mediante la especiación directa de los elementos seleccionados, tiene su principal limitación en el nivel de concentración de dichos elementos*

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

*en la muestra. Otra limitación adicional es la identificación y obtención de compuestos de referencia que puedan explicar las observaciones experimentales. [31].*

*Sin embargo, pocas técnicas instrumentales poseen la sensibilidad y selectividad suficientes para llevar a cabo con éxito análisis de especiación en muestras medioambientales de manera directa, siendo capaces de diferenciar entre las distintas formas químicas de un elemento.*

*La técnica del sincrotrón, proporciona información completa sobre las especies de un elemento en una muestra dada sin necesidad de un proceso de separación que pudiera alterar las formas químicas originales de nuestras muestras.*

*El primer paso realizado, fue la determinación de metales totales del apartado anterior, para posteriormente caracterizar la especiación de algunos de ellos.*

*El segundo paso fue preparar las muestras del material liofilizado y homogeneizado en seco haciendo pequeñas pastillas de aproximadamente 1 cm de diámetro cubiertas con cinta Kapton (transparente a los rayos X) para luego poder obtener sus espectros XANES correspondientes en la línea de luz.*

*Además, comparamos estos resultados con aquellos obtenidos con las técnicas convencionales con el fin de contrastarlos y dar robustez a nuestros estudios.*

*Las muestras utilizadas fueron las referenciadas*

- ✓ *Arcachon O-S.*
- ✓ *La Rochelle O-S.*
- ✓ *Sado O-S.*
- ✓ *Ebro M-C.*

#### Experimento XAS

*El análisis XAS se llevó a cabo en las instalaciones del sincrotrón ALBA (Barcelona), donde se analizaron arsénico (K-edge de 11.867 eV) y Zn (K-edge de 9659 eV) mediante la técnica de XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure). Para el Zn también se realizó la técnica*

*EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure), aunque no se usó un análisis detallado para esta última.*

*Todas las mediciones se realizaron en la línea de luz CLAES. La apertura vertical de las rendijas del haz fue de 0,5 mm, el monocromador utilizado es de doble cristal de Si (111), el ángulo vertical del enfoque del espejo es de aproximadamente 3,7 mrad (del inglés, Millon Radiation Absordod Dose), a temperatura ambiente. Debido al rango de concentración de los elementos seleccionados en la mayoría de las muestras y a la complejidad del entorno del metal seleccionado, las mediciones de las cuatro muestras se han realizado en el modo de fluorescencia por medio de un detector Amptek CdTe, y las mediciones de los espectros de referencia tanto para el As como para el Zn se recogieron en el modo de transmisión por medio de detectores de cámara de ionización.*

*Después del experimento, las muestras quedaron sin daños por radiación. Tampoco se detectaron anomalías en el ruido espectral. Todos los datos fueron analizados con el software Athenas (Demeter 0.9.13 ©Bruce Ravel).*

#### *Especiación de Arsénico (As), adquisición de los datos y técnica XANES.*

*Los compuestos de arsénico son bien conocidos como contaminantes en los ecosistemas acuáticos, que están naturalmente presentes en los ecosistemas marinos, los cuales, pueden llegar a bioacumular estos metales en sus tejidos, como producto de las actividades y características propias de su entorno [33, 34].*

*Alrededor del 70% de los usos de arsénico están relacionados con la producción de pesticidas, principalmente Metanoarsonato monosódico, Metanoarsonato disódico, ácido dimetilarsínico, y el ácido arsénico [34]. Además, el arsénico ha sido utilizado en la medicina, los medicamentos veterinarios, y en la fabricación de objetos de vidrio, aleaciones de metales, la microelectrónica y conservantes de la madera [35]. Las propiedades tóxicas de arsénico dependen de la forma química en la que se encuentra (por ejemplo, las especies toxicas arsenicales inorgánicos vs las formas no toxicas orgánicas de arsénico tales como arsenobetaína) [36].*

*Varios estudios se han realizado acerca del arsénico en la biota de la región de la costa del Mediterráneo. Las dos especies marinas más utilizadas como muestras son las ostras y los*

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

mejillones [37] porque son ampliamente empleadas para el consumo humano y tienen importante valor comercial de la zona.

Sabiendo la concentración total del As en nuestras muestras, el siguiente paso es la determinación de las especies químicas en las que se presenta, lo que incluye determinar el estado de oxidación así como también los correspondientes compuestos de arsénico.

Los espectros de los materiales de referencias fueron obtenidos de:

- ✓ Trióxido de diarsénico ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) como referencia de  $\text{As}^{\text{III}}$
- ✓ Arsenobetaina  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{AsO}_2$  (ASB), como referencia orgánica AsB
- ✓ Pentóxido de diarsénico ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ) como referencia de  $\text{As}^{\text{V}}$ .

Las muestras procedentes de Mar de Sado y la del Delta de Ebro son las más ruidosas por sus bajas concentraciones de As.

#### Especiación de Zinc (Zn) en las muestras, adquisición de los datos y técnica XANES

Aquí se utilizó el mismo conjunto de muestras que el descrito para el arsénico, con su misma identificación.

Zn es el elemento que se presenta en mayor concentración de todos los metales analizados. El Zn es un oligoelemento esencial de la biosfera. La esencialidad de este metal se muestra en su actuación en un gran número de funciones fisiológicas, derivadas de su presencia como cofactor en más de 200 enzimas, lo que provoca que sus niveles en tejidos de animales sean muy similares.

El zinc puede ser considerado, junto con el cadmio, como un metal muy biodisponible. Entre los factores que afectan a la movilidad y biodisponibilidad del zinc se encuentran el pH, el contenido de materia orgánica, el contenido de minerales de arcilla y el potencial redox. La movilidad del cinc decrece con el aumento de los valores de pH [34].

En nuestro caso, la especiación de zinc, está basada en la identificación o el reconocimiento de los elementos o grupos funcionales que rodean su entorno químico.

Una de las especies más conocida y mencionadas como especie química de zinc en los moluscos, estudiada por varios autores [38] son las metalotioneinas (MTs). Las MTs son proteínas no enzimáticas, de cadena única, de bajo peso molecular, con un contenido alto en metal y azufre. Los estudios sobre su estructura, función y regulación molecular llevaron

a pensar en un papel central de estas moléculas en la regulación y detoxificación de metales esenciales, así como en la detoxificación de los metales no esenciales.

En cuanto a su estructura y propiedades moleculares, las MTs se caracterizan por presentar un bajo peso molecular (6-10 kD) y una secuencia de 61 o 62 aminoácidos, con una elevada proporción de cisteína, que representa entre un 20 y 30 % de los residuos de aminoácidos totales (un total de 20 cisteínas). Esta proteína es capaz de unir estrecha y específicamente cationes como  $\text{Cu}^{+1}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  mediante los átomos de azufre de los residuos de cisteína [38].

Como se puede ver en la figura 14, las MTs de mamíferos están organizadas espacialmente en dos agrupaciones o clusters, el dominio  $\alpha$  (cluster de 4 átomos de metal) y el dominio  $\beta$  (cluster de 3 átomos de metal). Sin embargo, en algunos invertebrados, se ha descrito la existencia de dos clusters con 3 átomos de metal cada uno que sería equivalente a dos dominios  $\beta$  de los anteriormente citados.

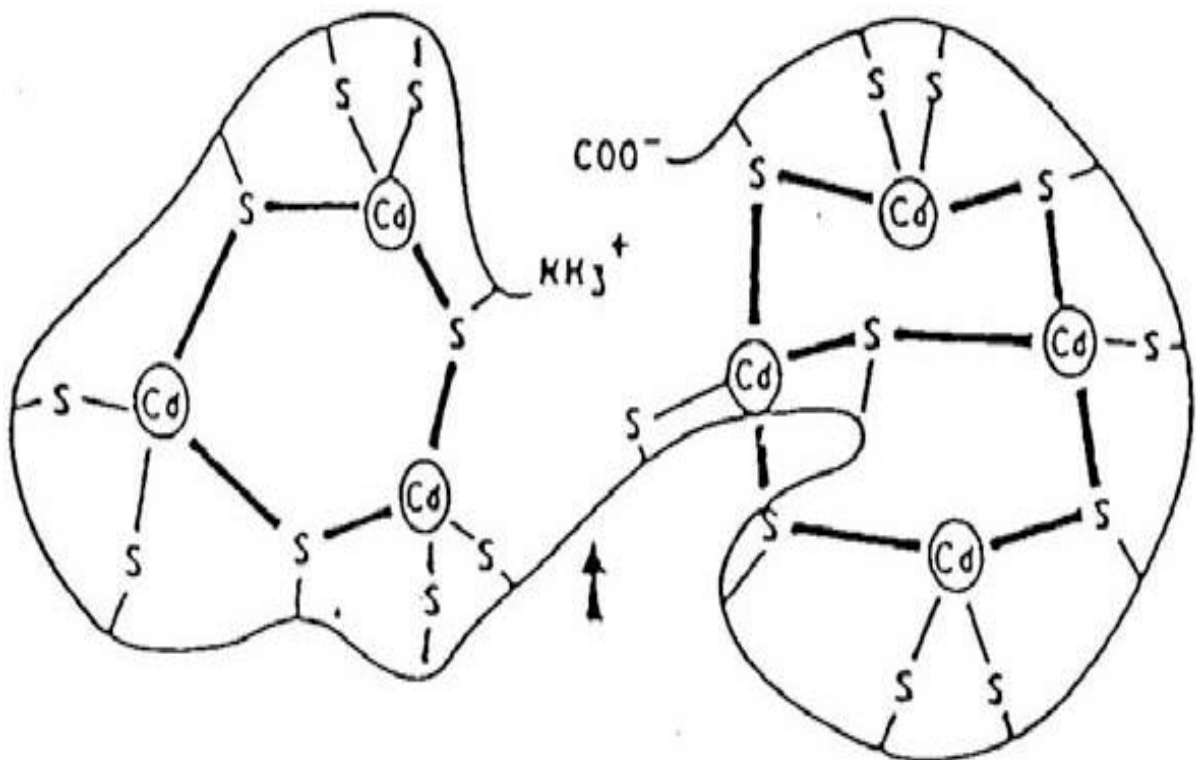


Figura 14. Estructura de la metalotioneína dividida en dos dominios, propuesta por Winge y Miklossy (1982).

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

*La síntesis de MT en los moluscos puede ser inducida por una gran variedad de estímulos, entre los que se incluyen ciertos metales, hormonas, toxinas y el estrés [38], siendo los metales los inductores más potentes.*

*De las numerosas especies de invertebrados acuáticos en las que se han identificado las MTs, la mayoría son moluscos (bivalvos y gasterópodos) o crustáceos.*

*Existen revisiones sobre el metabolismo de metales en moluscos [39] y sobre las MTs de invertebrados acuáticos [40] que abordan este tema. Las primeras MTs descritas en invertebrados fueron las purificadas en la ostra (*Crassostrea virginica*) y el mejillón (*Mytilus edulis*) [41, 42]. Actualmente se conoce la secuencia aminoacídica parcial o total de las MTs de varios moluscos [43, 44, 45]. Su similitud con la MT de mamíferos ha llevado a clasificarlas como MT de clase I.*

*El metabolismo de los metales ha sido particularmente bien estudiado en el caracol marino *Littorina littorea* [46, 47, 48], y en el gasterópodo terrestre *Helix pomatia* [49].*

*A nivel comercial era prácticamente imposible conseguir estas MTs para hacer nuestra caracterización del Zn, por lo que hemos decidido hacer una producción asistida por la Universitat de Barcelona, facultad de biología, departamento de genética, haciendo producir al gasterópodo terrestre *Helix pomatia* varias isoformas de la MTs, y una producción de una MTs de mamífero (ratón). La descripción de la metodología y sus caracterizaciones y certificado de análisis están en anexo X.*

*Estas isoformas son estructuras de dos clústeres unidos a 3, 4, 5 y 6 metales de Zn, también se incluyeron especies inorgánicas del zinc para la caracterización de este elemento en nuestras muestras, identificándolas (ID) como se indica en la Tabla 2.*

<b>Referencias</b>				
<i>Especies inorgánicas</i>	<i>ID</i>	<i>Especies orgánicas de las Metalotioneína</i>	<i>ID</i>	<i>Composición</i>
<i>Cloruro de zinc</i>	<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	<i>Metalotioneína mixta con diferentes clúster</i>	<b>Zn6_Zn4/5</b>	Zn6 (43%), Zn4 (22%) Zn5 (22%), Zn3 (9%), Zn2 (4%)
		<i>Metalotioneína con un solo clúster 3</i>	<b>Zn3</b>	Zn3 (100%)
<i>Sulfuro de zinc</i>	<b>ZnS</b>	<i>Metalotioneína con diferentes clúster</i>	<b>Zn4/5</b>	Zn4 (31%), Zn5 (28%), Zn6 (22%), Zn3 (16%), Zn2 (3%)
		<i>Metalotioneína mixta con dos clúster 6 y 5</i>	<b>Zn6</b>	Zn6 (80%), Zn5 (20%)

Tabla 2. Referencias usadas en el tratamiento de los datos espectrales XANES en la caracterización de nuestras muestras.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### Referencias del capítulo

- [1] Thomas R., *Abeginner's guide to ICP-MS, Spectroscopy tutorial* 16(5), 2001.
- [2] *Applications and Technology of a New ICP-MS Spectrometer,* Atomic Spectroscopy, Special Issue, Vol. 16, No. 1, Jan/Feb, 1995.
- [3] S. Ghidini, A. Ianieri, E. Zanardi, M. Conter, T. Boschetti, P. Iacumin, P.G. Bracchi, *Ann. Fac. Medic. Vet. Parma* 26 (2006) 193.
- [4] STADTMAN, E.R. and LEVINE, R.L. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207–218.
- [5] Gandemer, G. (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, 62, 309–321.
- [6] Livingston, D. J., & Brown, W. D. (1981). The chemistry of myoglobin and its reactions. *Food Technology*, 35, 244–252.
- [7] Weigand E, Kirchgeßner W (1981) *Arch Gefl\_gelkde* 45:3–8
- [8] Sandoval M, Henry PR, Littell RC, Miles RD, Butcher GD, Mamerman CB (1999) *J Anim Sci* 77:1788–1799
- [9] Anke M, Angelow L (1995) *Fresenius J Anal Chem* 352:236–239
- [10] Meghen CN, Scott CS, Bradley DG, Machugh DE, Loftus RT, Cunningham EP (1998) *Anim Genet* 29:48–49
- [11] Bettina M. Franke · G\_rard Gremaud · Ruedi Hadorn · Michael Kreuzer., *Geographic origin of meat—elements of an analytical approach to its authentication.*, *Eur Food Res Technol* (2005) 221:493–503
- [12] Simon Kellya,\*, Karl Heatonb and Jurian Hoogewerff., *Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis.*, *Trends in Food Science & Technology* 16 (2005) 555–567.
- [13] Aiello D., De Luca D., Gionfriddo E., Naccarato A., *Multistage mass spectrometry in quality, safety and origin of foods.* *Eur. J Mass Spectrom*, 17, 1-31 (2011)
- [14] Voerkelius Susanne a,\*, Lorenz Gesine D. a, Rummel Susanne b, Quétel Christophe R. c, Heiss Gerhard d, Baxter Malcolm e, Brach-Papa Christophe c, Deters-Itzelsberger Peter b, Hoelzl Stefan b, Hoogewerff Jurian f, Ponzevera Emmanuel c, Van Bocxstaele Marleen c, Ueckermann Henriette ., *Strontium isotopic signatures of natural mineral waters, the reference to a simple geological map and its potential for authentication of food.*, *Food Chemistry* 118 (2010) 933–940.
- [15] Green, R.O. y col., *“Imaging Spectroscopy and the Airborne Visible/Infrared Imaging Spectrometer (AVIRIS)”*, *Remote Sensing of Environment*, vol. 65, pp. 227-248, 1998.
- [16] Serra, J., *Image Analysis and Mathematical Morphology, Volume 1.* Academic Press, London, 1993.
- [17] Sun, D.-W. (2010). *Hyperspectral Imaging for food quality Analysis and Control.* Dublin: Elsevier
- [18] Stehman, S.V., *“Selecting and Interpreting Measures of Thematic Classification Accuracy”*. *Remote Sensing of Environment*, vol. 62, pp. 77-89, 1997.
- [19] Theiler, J., Gisler, G., *“A contiguity-enhanced k-means clustering algorithm for unsupervised multispectral image segmentation”*, en: *Proc. SPIE*, vol. 3159, pp. 108-118, 1997.
- [20] Richards, J. A., *Remote Sensing Digital Image Analysis: An Introduction.* Springer-Verlag, Berlin, 1993.
- [21] Plaza, P. Gamba, K. Bakos, B. Waske, *“HYPERINET\_D4.2 – Processing Chain Implementation Report”*, Enero, 2009 (<http://www.hyperinet.eu>).
- [22] Qian, S.-E y col., *“Vector quantization using spectral index-based multiple subcodebooks for hyperspectral data compression”*. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, vol. 38, pp. 1183–1190, 2000.
- [23] Plaza A., Chang, C.-I., *High Performance Computing in Remote Sensing*, CRC Press, 2007.
- [24] Ifarraguerri, A., Chang, C.-I., *“Multispectral and hyperspectral image analysis with projection pursuit,”* *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, vol. 38, pp. 2529-2538, 2000.
- [25] M. Fernandez-Garcia, *Catalysis Reviews*, 44 (1), 59 (2002).
- [26] G.A. Waychunas, *Am. Mineral.* 72, 89 (1987).
- [27] J. Wong; F.W. Lytle; R.P. Messner; D.H. Maylotte, *Phys. Rev. B* 30, 5596 (1984).
- [28] M.N. Piancastelli, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* 100, 167 (1999).
- [29] E.R. Malinowski, *“Factor Analysis in Chemistry”*, 2nd edition, Wiley, New York, (1991).
- [30] Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C. (2005). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*. 140: 175-186.
- [31] Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13: 57-149.



- [32] Peakall DB. (1994). *The role of biomarkers in environmental assessment (1) Introduction*. *Ecotoxicology*. 3: 157-160.
- [33] Bissen, M., Frimmel, F.H., 2003. *Arsenic- a review. Part I: Ocurrence, toxicity, speciation, Mobility*. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 31, 9-18
- [34] Bradl, H.B., 2005. *Heavy Metals in the environment. Chapter 1: Sources and origins of heavy metals*. Ed. H.B. Bradl
- [35] Apostoli, P., Cornelis, R., Duffus, J., Lison, D., Templeton, D., 2006. *Elemental speciation in human health risk assessment, Environmental health criteria 234*. Ed. World Health Organization. I.S.B.N.: 92 4 127232 5
- [36] T. Dagnac a, A. Padro´ b, R. Rubio a,\*, G. Rauret ., *Speciation of arsenic in mussels by the coupled system liquid chromatography—UV irradiation—hydride generation-inductively coupled plasma mass spectrometry.*, *Talanta* 48 (1999) 763–772
- [37] Marianne Köck a, Marinella Farré a, Elena Martínez a, Krisztina Gajda-Schrantz b, Antoni Ginebreda a, Asunción Navarro a, Miren López de Alda a,\*, Damià Barceló ., *Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain).*, *Journal of Hydrology* 383 (2010) 73–82
- [38] Klaassen, C.D.; Liu, J.; Choudhuri, S. (1999) "Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 267- 94.
- [39] Langston, W.J.; Bebianno, M.J.; Burt, G.R. (1998) "Metal handling strategies in molluscs". En: *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Langston, W.J.;Bebianno, M.J. (Ed). Chapman & Hall, London
- [40] Amiard, J.C.; Amiard-Triquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P.S. (2006) "Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers". *Aquatic Toxicology*. 76: 160-202.
- [41] Casterline, J.L., Jr.; Yip, G. (1975) "The distribution and binding of cadmium in oyster, soybean, and rat liver and kidney". *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*. 3: 319-29.
- [42] Noel-Lambot, F. (1976) "Distribution of cadmium, zinc and copper in the mussel *Mytilus edulis*. Existence of cadmium-binding proteins similar to metallothioneins". *Experientia*. 32: 324-25.
- [43] Park, J.S.; Chung, S.; Park, I.S.; Kim, Y.; Koh, C.; Lee, I.S. (2002) "Purification and characterization of metallothionein-like cadmium binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 131: 425-31.
- [44] English, T.E.; Storey, K.B. (2003) "Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*". *J Exp Biol*. 206: 2517-24.
- [45] Ryu, S.K.; Park, J.S.; Lee, I.S. (2003) "Purification and characterization of a copperbinding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 134: 101-07.
- [46] Mason, A.Z.; Nott, J.A. (1981) "The role of intracellular biomineralised granules in the regulation and detoxification of metals in gastropods with special reference to the marine prosobranch *Littorina littorea*". *Aquatic Toxicology*. 1: 239-56.
- [47] Mason, A.Z.; Simkiss, K.; Ryan, K.P. (1984) "The ultrastructural localisation of metals in specimens of *Littorea littorea* collected from clean and pollutes sites". *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 64: 699-720.
- [48] Bebianno, M.J.; Langston, W.J.; Simkiss, K. (1992) "Metallothionein induction in *Littorina littorea* (Mollusca: Prosobranchia) on exposure to cadmium". *Journal Of The Marine Biological Association Of The United Kingdom*. 72: 329-42.
- [49] Dallinger, R.; Berger, B.; Hunziker, P.; Kägi. J.H. (1997) "Metallothionein in Snail Cd and Cu Metabolism". *Nature* 388: 237-38.



**4.**

***RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN***

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*Los resultados que se exponen a continuación se han descrito siguiendo las muestras estudiadas. Dentro de los resultados obtenidos para cada muestra, se han detallado de forma diferenciada, los obtenidos por las distintas metodologías empleadas en el presente estudio.*

### **4.1 Jamón curado**

#### **4.1.1 Resultados del estudio mediante ICP-MS**

*A pesar que se han analizado 16 elementos por ICP-MS, para el propósito de este trabajo y su trascendencia en el estudio, sólo se han recogido los resultados correspondientes a seis elementos en los que se basará el estudio comparativo realizado. Los valores de concentración y desviación estándar de todos ellos se encuentran en la tabla D del anexo VI.*

*Las variaciones en el comportamiento de las concentraciones de los metales seleccionados en cada muestra jamón se pueden visualizar en figura 15. Como se observa, el Fe y Zn tienen un comportamiento muy similar entre las muestras, al igual que los metales Sr y Cd aunque la dispersión entre las muestras italianas es mayor en el Sr, pero siempre la muestra italiana San Danielle presenta mayor valor que la muestra italiana Parma, en el caso de Cu y Rb la situación es un poco diferente entre las muestras ibéricas e italianas, pero nótese que siempre la muestra Badajoz 21 presenta resultados similares a la portuguesa.*

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

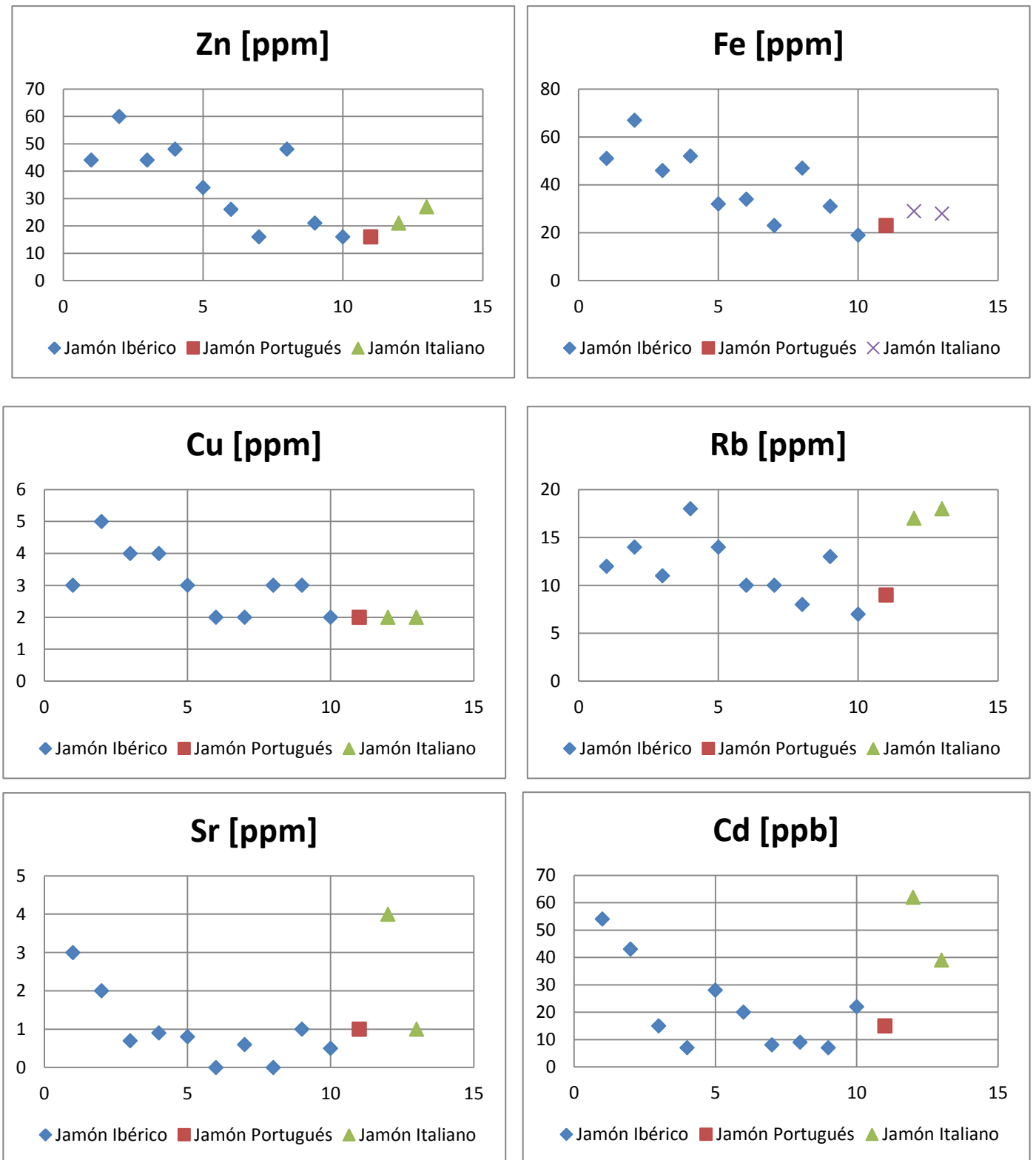


Figura 15. Relación de la concentración de distintos metales en las diferentes muestras de jamón.

En función de los resultados obtenidos en la cuantificación del contenido metálico de los diferentes jamones estudiados, se puede extraer las siguientes conclusiones:

- Las diferencias de concentraciones metálicas que se observan entre las tres zonas de estudio se deben fundamentalmente a los factores ambientales y a la alimentación que reciben los distintos tipos de cerdo de los que proceden los jamones. Así, los cerdos que nacen y viven en extensivo (en la dehesa “ibéricos” y “portugués”) tienen aportes diferenciados por su constante interacción con el medio natural. En cambio, los cerdos que nacen y crecen confinados en granja (italianos), el aporte fundamental proviene exclusivamente del pienso y del agua que ingieren. En este sentido, es posible indicar en general que la alimentación es el factor más influyente en los aportes de metal encontrados en los jamones.
- En los metales mayoritarios, un dato relevante es el valor del boro en la muestra correspondiente al tiempo de curado de 03 meses, excesivamente elevado comparado con los demás, es muy probable que al ser el único jamón que está en la etapa inicial de curación, esta concentración esté dada por la adición de algún tipo de aditivo como conservante microbiológico utilizado en el proceso [1].
- Tanto el Zn como el Fe, que son nuestros metales de interés y que posteriormente serán analizados mediante la técnica de sincrotrón, están en concentraciones adecuadas, para su estudio por esta técnica (>10 ppm). Los valores encontrados para estos dos elementos son superiores al resto de metales analizados debido al papel específico que juegan ambos metales en la fisiología de los mamíferos [1]

#### **4.1.2 Resultados del estudio mediante dilución isotópica**

Una posible identificación del origen geográfico de un alimento, está basada en la correlación de los valores de la relación  $^{87/86}\text{Sr}$  del alimento con la correspondiente relación del suelo de la zona geográfica de la que procede el alimento.

En la figura 16, se observan los resultados para el ratio isotópico de Sr y las posiciones en que se colocan las muestras una respecto a la otra, donde básicamente se pueden identificar tres grupos de acuerdo a la similitud de la relación isotópica de Sr, el grupo 1 es el rango más alto hasta llegar al grupo tres con menor valor de la relación isotópica. Como se ha comentado, la similitud entre ellos viene dada por las características que presentan

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

sus zonas de origen. Así, haciendo una comparación con los resultados de las concentraciones isotópicas de las regiones Europeas [2] se estima que la gran mayoría del suelo español tiene una concentración isotópica de Sr comprendida en un rango de 0,70701-070900 y una mínima parte en rangos de 0,70901-0,71100, ambas coinciden con el territorio italiano, descritos en el mapa de valores para isotopos de Sr (ver figura I, anexo VI) como sedimentos de origen cenozoico y mesozoico.

Los valores de la relación  $^{87/86}\text{Sr}$  y su desviación estándar están en la Tabla D, del anexo VI.

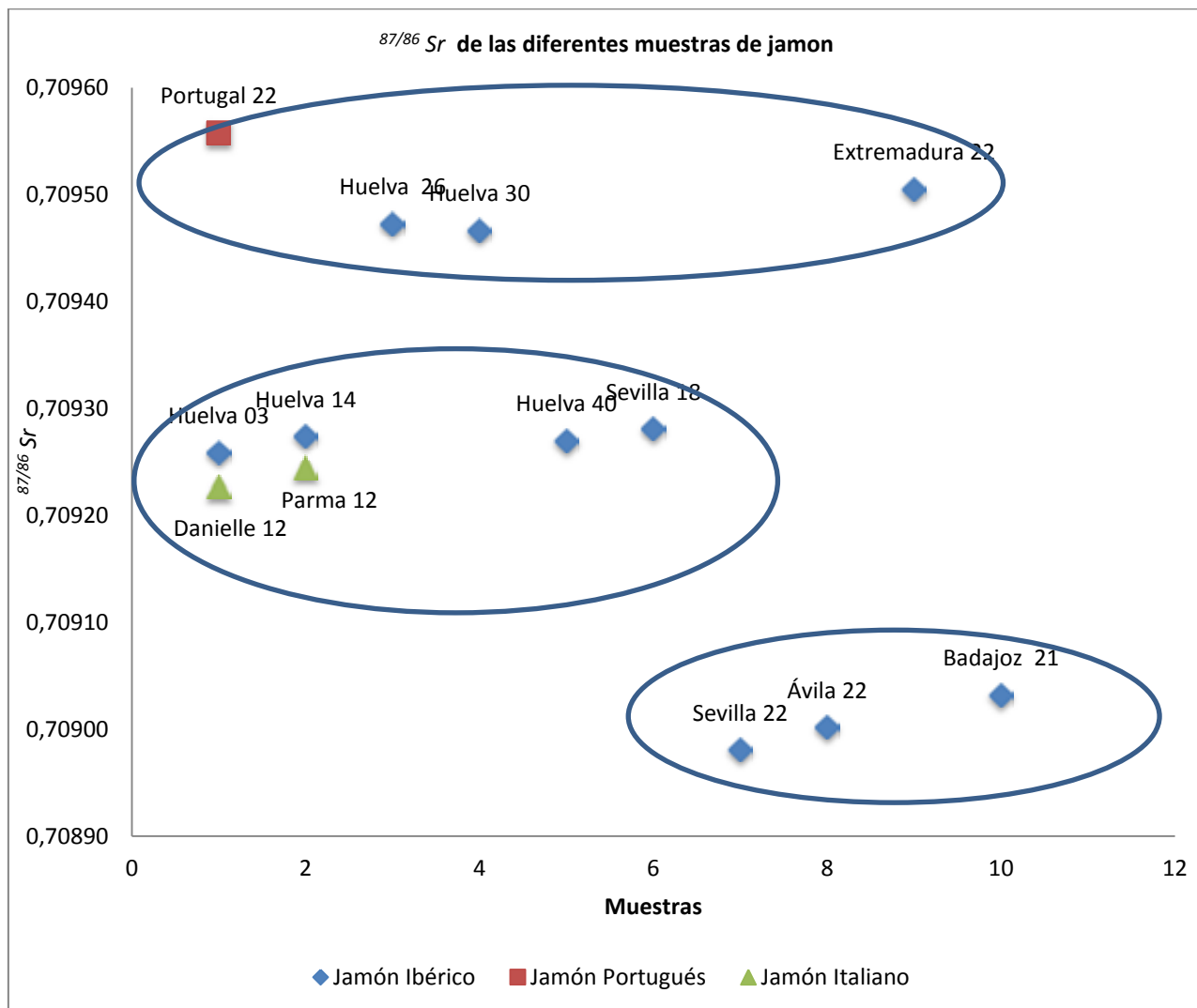


Figura 16. Predicción isotópica en base a la relación de concentración isotópica  $^{87/86}\text{Sr}$ .

*En función de los resultados, se puede extraer las siguientes conclusiones:*

- *La determinación isotópica del elemento Sr, contribuyó a la asignación geográfica de las diferentes muestras. La concentración en las muestras obtenidas de la región Italiana de Parma presenta un ligero aumento de su concentración frente a la de San Danielle, que puede ser atribuido a la alimentación de la dieta de los cerdos en estas zonas [3].*
- *Las asignaciones isotópicas de los jamones estudiados, confirma que hemos trabajado con jamones procedentes de cada una de las regiones involucradas y por consiguiente, de la autenticidad de los mismos.*
- *Las similitudes de las relaciones encontradas para las muestras de los jamones de Huelva (03, 14 y 40 meses por un lado y 26 y 30 meses por otro) pueden indicar que el productor de jamones cambió de proveedor porcino y por lo tanto las muestras obtenidas de uno u otro periodo pertenecen a cerdos de otras zonas o puede indicar un cambio del origen del pienso con el que se alimentan los cerdos entre temporadas de montañera.*
- *Las regiones de Sevilla, Ávila y Badajoz presentan similitudes en sus valores  $^{87/86}\text{Sr}$ , el cual puede ser atribuido a las significativas similitudes de estas regiones en el agua mineral natural y en la superficie territorial de cada región, produciendo así parámetros isotópico relevante en algunos alimentos y suelo [2].*

#### **4.1.3 Resultado del estudio mediante imágenes hiperespectrales**

*Antes del análisis las muestras fueron tratadas como se explicó anteriormente en el apartado 1.2.1.5.*

*En primer lugar y dada la heterogeneidad de una pieza de jamón, se llevó a cabo la identificación de la parte del jamón más representativa para nuestro estudio. Para ello,*



#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

utilizamos la información hiperespectral de las muestras A1, A2 y A3, que, después de un análisis de PCA, como se muestra en la figura 17, un solo PC explica más del 80% de la varianza, lo que demuestra que las muestras tomadas de Caña y Maza, tienen espectros similares entre sí; sin embargo, las muestras tomadas de "Babilla" son muy diferentes, donde su contribución a la variación de la grafica de la PC da a entender que esta parte del jamón es diferente ya que no se agrupa con las demás, por no presentar similitudes entre sus espectros. Esta diferencia obtenida por el análisis de PCA en las zonas estudiadas puede ser debido a que el músculo en esa zona presenta más actividad que las demás por lo que puede generar características diferentes. [4]. Por lo tanto, esto fue decisivo a la hora de hacer la toma de muestra de los demás jamones utilizados.

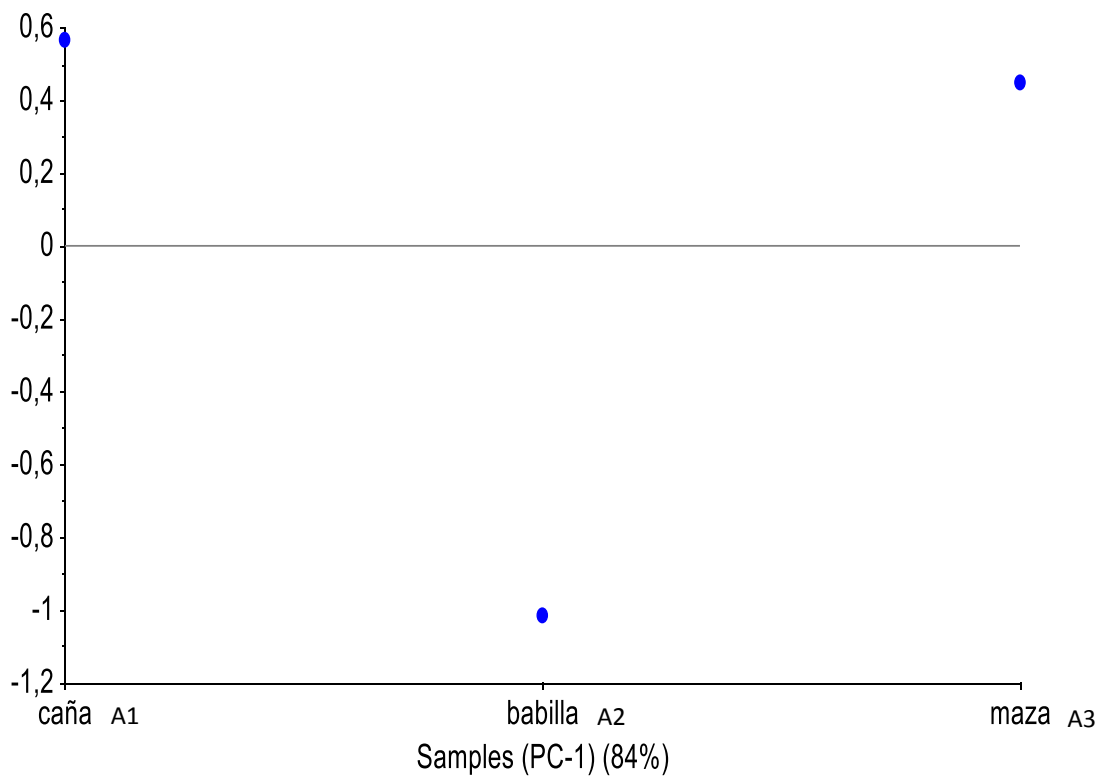


Figura 17. Análisis de PCA de las diferentes zonas del jamón curado caña (A1), babilla (A2) y maza (A3).

El análisis de PCA en resto de muestras (B1 a C4), fueron dos vectores principales (PCs) representado en la Figura 18. La primera PC explica el 86 % de la variación de las mediciones NIR, y la segunda PC el 11%, tanto para la calibración y la varianza de validación cruzada. La separación en PC1 de los espectros de las muestras de jamones españoles e italianos es muy clara. Los datos españoles, representados como cajas azules, son los que tiene menos dispersión que los italianos y todos ellos presentan valores negativos con referencia a la PC1. Los datos italianos, dibujados como puntos de color naranja, tienen valores positivos en PC1 y presentan más difusión en PC2.

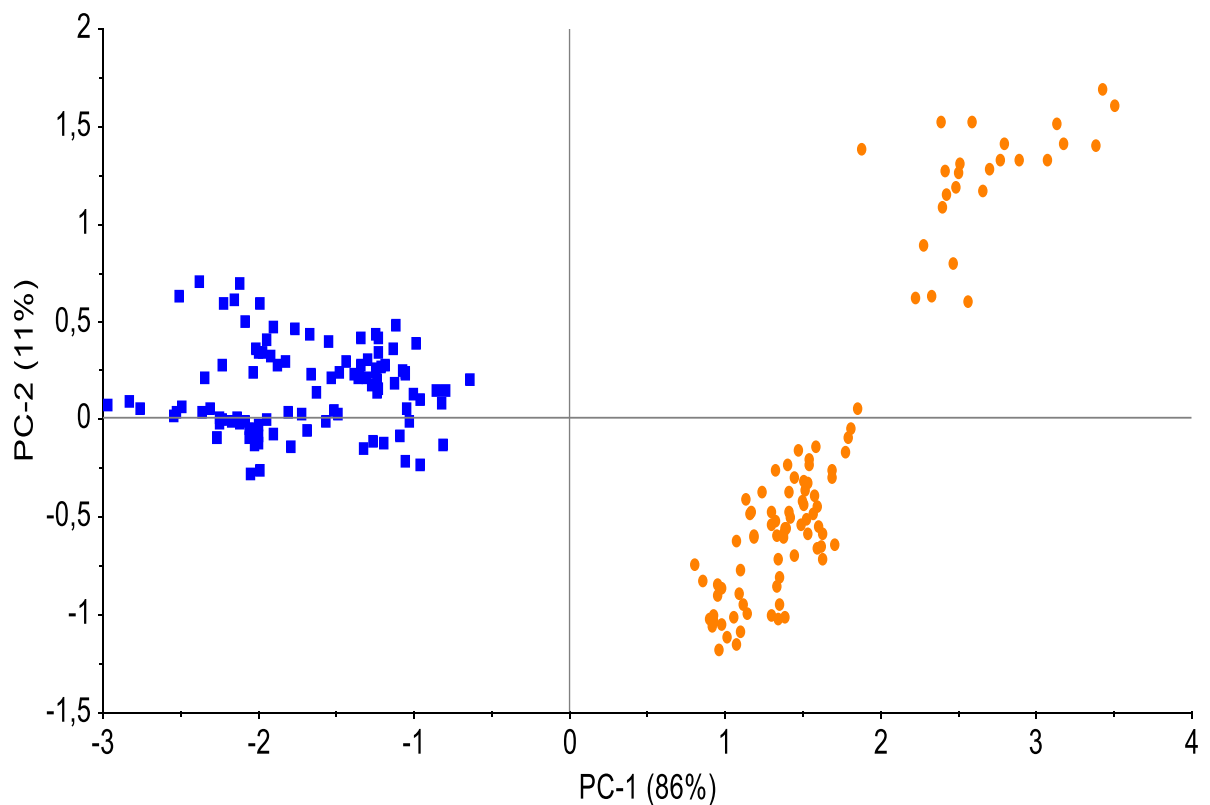


Figura 18. Análisis de las muestras de jamón Ibérico (cuadrados azules) e italiano (círculos naranjas) mediante PCA.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### Análisis parcial discriminante de los mínimos cuadrados parciales (PLS-DA)

Las variaciones en la matriz  $X$  y el vector  $Y$  fueron descritos por 2 factores (FS) con una varianza explicada de 86 % y 90 %, respectivamente. Este número relativamente pequeño de FS sugiere baja correlación química en los espectros de diferentes tipos de jamón, pero las similitudes en los espectros dentro de las clases; es decir, el bajo número de Fs proporciona una indicación de la buena capacidad del modelo para describir las clases propuestas. Los valores estadísticos de regresión mostraron un RMSEC de 0.114, un RMSECV de 0.116 y  $r^2$  de la CV de 0.947.

La figura 19 muestra la dispersión de las muestras del modelo PLS-DA. El valor de corte se determinó con respecto a la predicción vs línea de regresión de referencia. El error en las predicciones  $Y$  se fijó a  $\pm 0,30$  para el jamón ibérico e italiano. Esto significa que todas las muestras que han sido estimadas dentro de los límites establecidos por el valor Hotelling  $T^2$  y  $Q$  valor residuales en un nivel de confianza del 95% y con un valor  $Y$  0,70-1,30, serán clasificados como pertenecientes a la clase de ibérica, mientras que aquellos con un valor  $Y$  1,70-2,30, serán clasificados como pertenecientes a la clase de italiano (Tabla 3), los resultados generales después de dos pasos se muestran en la figura 20, donde se clasificaron correctamente todas las muestras figura 21

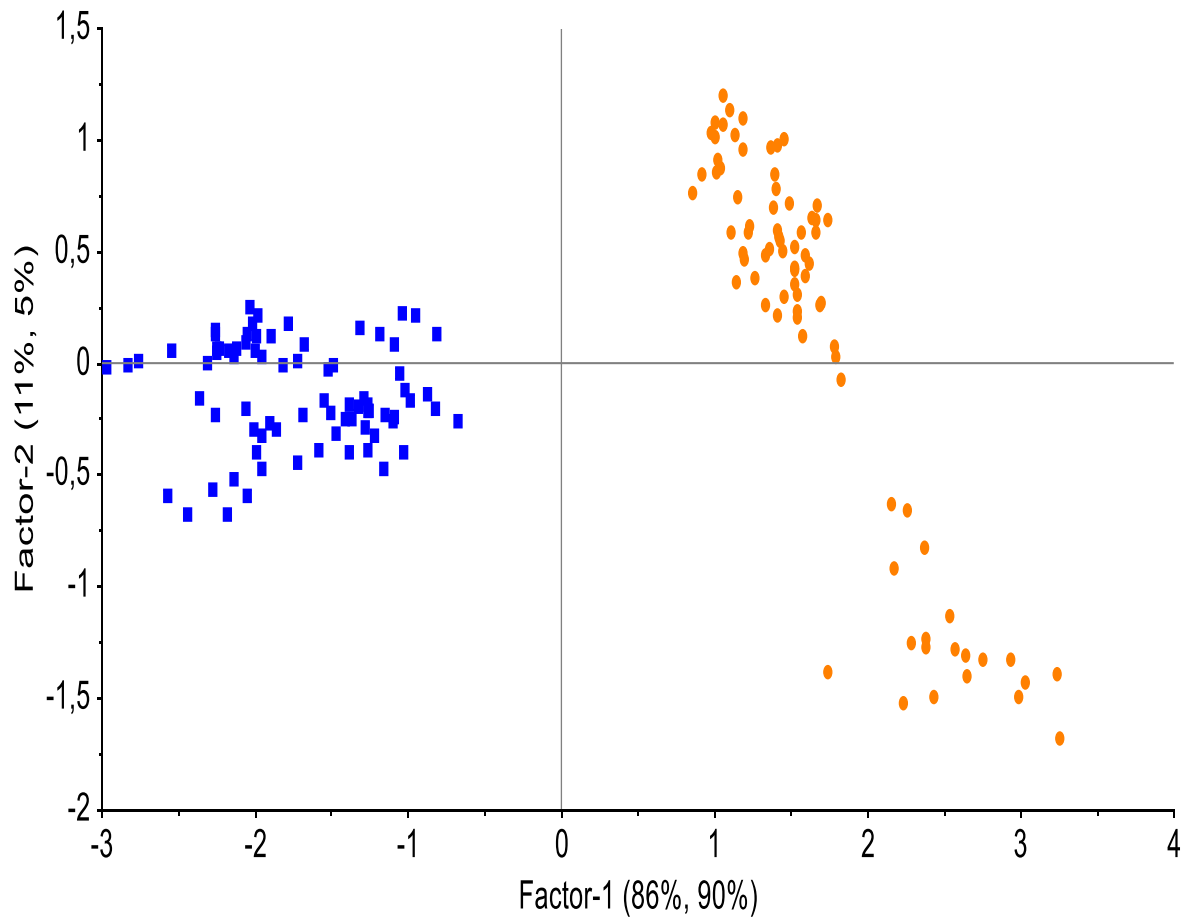


Figura 19. Dispersión de las muestras en el modelo PLS-DA con dos factores, los cuadros azules corresponden al jamón Ibérico y los círculos naranjas a las del jamón italiano.



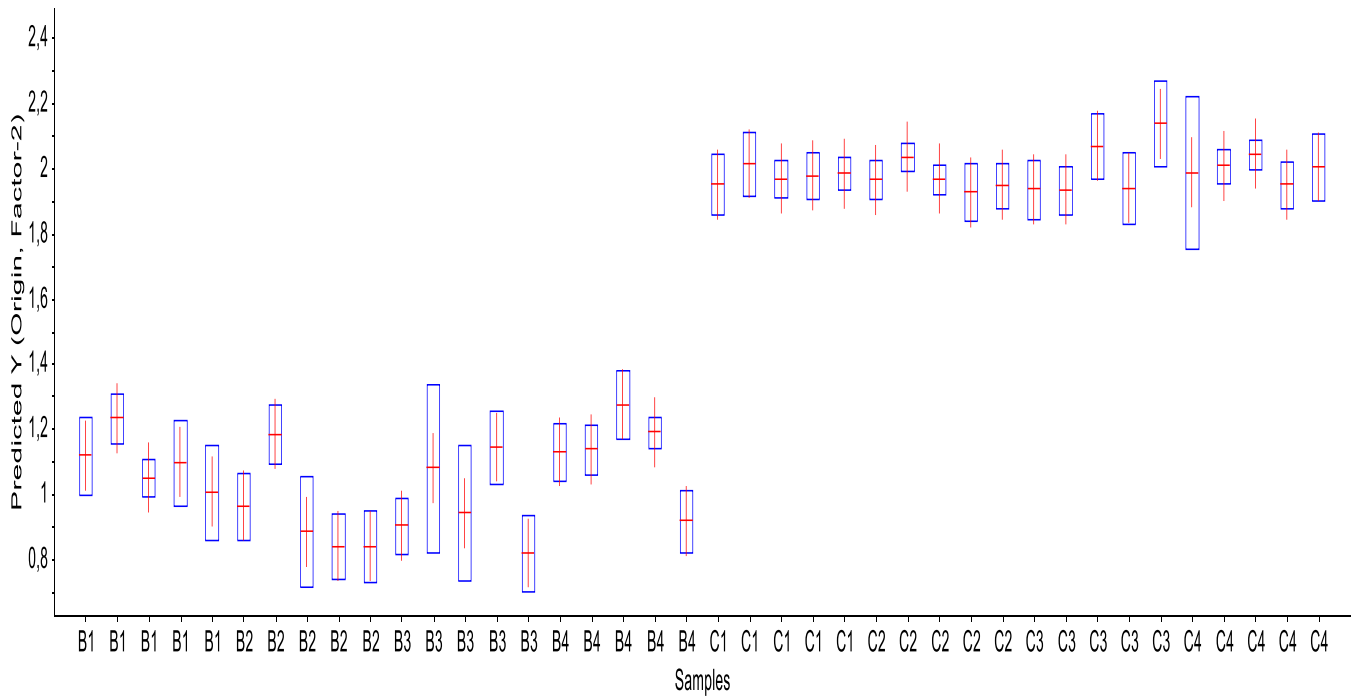


Figura 21. Clasificación de la predicción de los espectros NIR usando un modelo PLS-DA de dos factores.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestra	Referencia	Predicción Y	St. Dev.	Muestra	Referencia	Predicción Y	St. Dev.
B1	1	1,12	0,12	C1	2	1,95	0,09
B1	1	1,23	0,08	C1	2	2,01	0,10
B1	1	1,05	0,06	C1	2	1,97	0,06
B1	1	1,10	0,13	C1	2	1,98	0,07
B1	1	1,00	0,14	C1	2	1,98	0,05
B2	1	0,96	0,10	C2	2	1,96	0,06
B2	1	1,18	0,09	C2	2	2,03	0,04
B2	1	0,88	0,17	C2	2	1,96	0,05
B2	1	0,84	0,10	C2	2	1,93	0,09
B2	1	0,84	0,11	C2	2	1,95	0,07
B3	1	0,90	0,08	C3	2	1,93	0,09
B3	1	1,08	0,26	C3	2	1,93	0,08
B3	1	0,94	0,21	C3	2	2,07	0,10
B3	1	1,14	0,11	C3	2	1,94	0,11
B3	1	0,82	0,12	C3	2	2,13	0,13
B4	1	1,13	0,09	C4	2	1,98	0,23
B4	1	1,14	0,08	C4	2	2,00	0,05
B4	1	1,27	0,11	C4	2	2,04	0,05
B4	1	1,19	0,05	C4	2	1,95	0,07
B4	1	0,92	0,10	C4	2	2,00	0,10

*Tabla3. Clasificación de los espectros NIR de la predicción usando el modelo PLS-DA con dos factores.*

*Los resultados de este estudio sugieren que un sistema de imágenes hiperespectrales en la región del infrarrojo cercano, junto con métodos multivariantes de análisis estadístico, se puede utilizar para la identificación y clasificación de jamón curado en función de su tipología y origen geográfico. La técnica es rápida y no destructiva, y se puede realizar directamente en toda una loncha de jamón.*

*Estos resultados se obtuvieron usando un dispositivo de laboratorio. El refinamiento de ésta puede permitir mediciones de calidad no destructivas y rápidas en la planta de procesamiento.*

*Sin embargo, un mayor número de muestras con características diferenciadas deberían ser estudiadas para determinar correctamente la potencia de clasificación de este método.*

**4.1.4 Resultado del estudio mediante la técnica sincrotrón**

*Los espectros XANES de las muestras analizadas para la absorción normalizada de la energía del Fe, pueden verse en la Figura 22A, donde se puede observar diferentes desplazamientos según sea el estado de oxidación que se encuentre en la muestra según su tiempo de curación y/o parte de muestreo, no sucediendo esto en las muestras analizadas para la absorción de energía de Zn, figura 22B.*

*La figura 23, muestra los espectros de las referencias seleccionadas para el hierro (A) y para el zinc (B) junto con las muestras de jamón ibérico, observándose la similitudes y diferencias entre sus espectros.*



#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

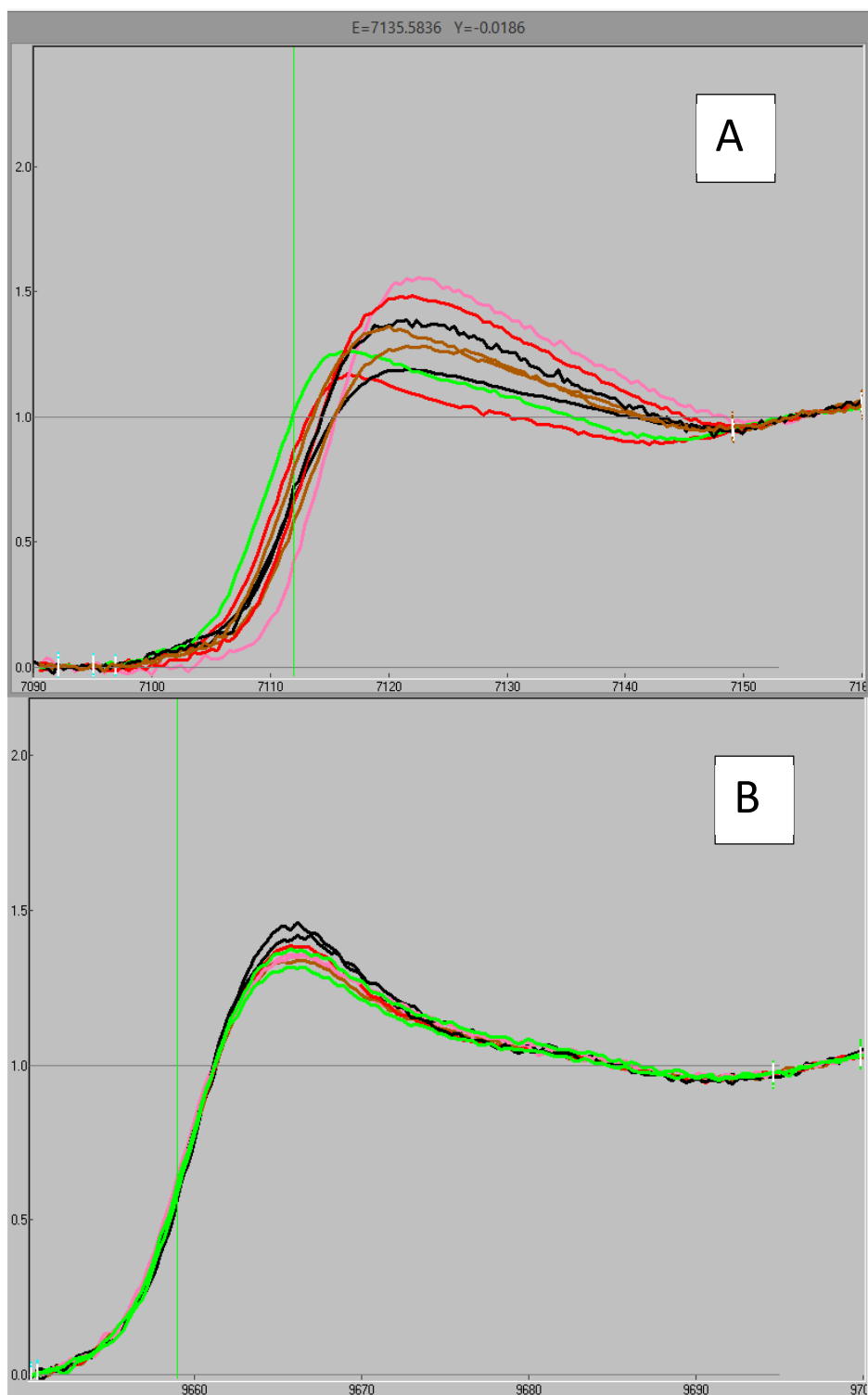


Figura 22. Espectros XANES de las muestras de jamón Ibérico, Fe (A) y Zn (B).

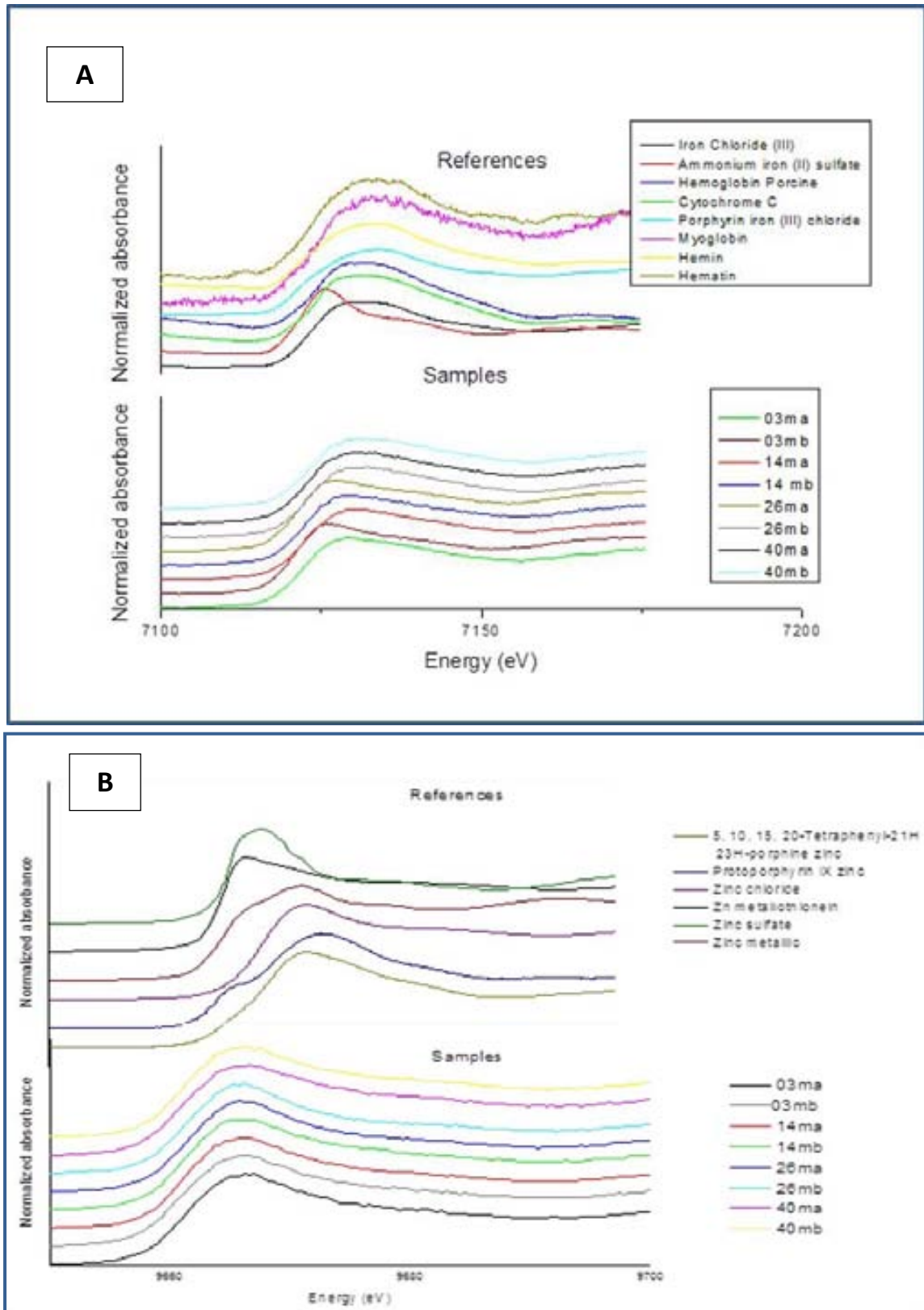


Figura 23. Espectros de muestras y referencias del experimento XAS, en la región XANES, Fe (A) y Zn (B).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Los espectros correspondientes a las referencias de especies de hierro inorgánico que mayormente son características del suelo (Óxido de hierro, Goethita, Hematita y Magnetita) no se asemejan a los espectros de las muestras del jamón, lo que indica que no solo el estado de oxidación del hierro es importante a considerar en el análisis sino también la coordinación del mismo dentro del compuesto, por lo que no figuran en la figura 23A.*

*Respecto al Zn, las referencias sulfato de zinc y la metaloproteína de zinc características de los moluscos no contribuyen en nuestros espectros del jamón, se puede observar a simple vista lo diferente de los espectros, figura 23B.*

*Los datos obtenidos por el análisis de PCA, se muestran en la figura 24, en la que se describe las correlaciones entre los espectros utilizados para el análisis, tanto para el zinc como para el hierro la contribución del primer componente representa un mayor porcentaje, que al retirarse la línea abstracta (línea roja) no se ajusta al espectro de la muestra. Las demás componentes, representada por la línea abstracta verde y azul indican que las correlaciones entre ciertas regiones espectrales de las referencias y las muestras es una contribución menor, pero de igual modo importante. A la hora de realizar el análisis de combinación lineal, la reconstrucción se hará con las referencias que previamente se hayan identificado con el PCA y TT.*

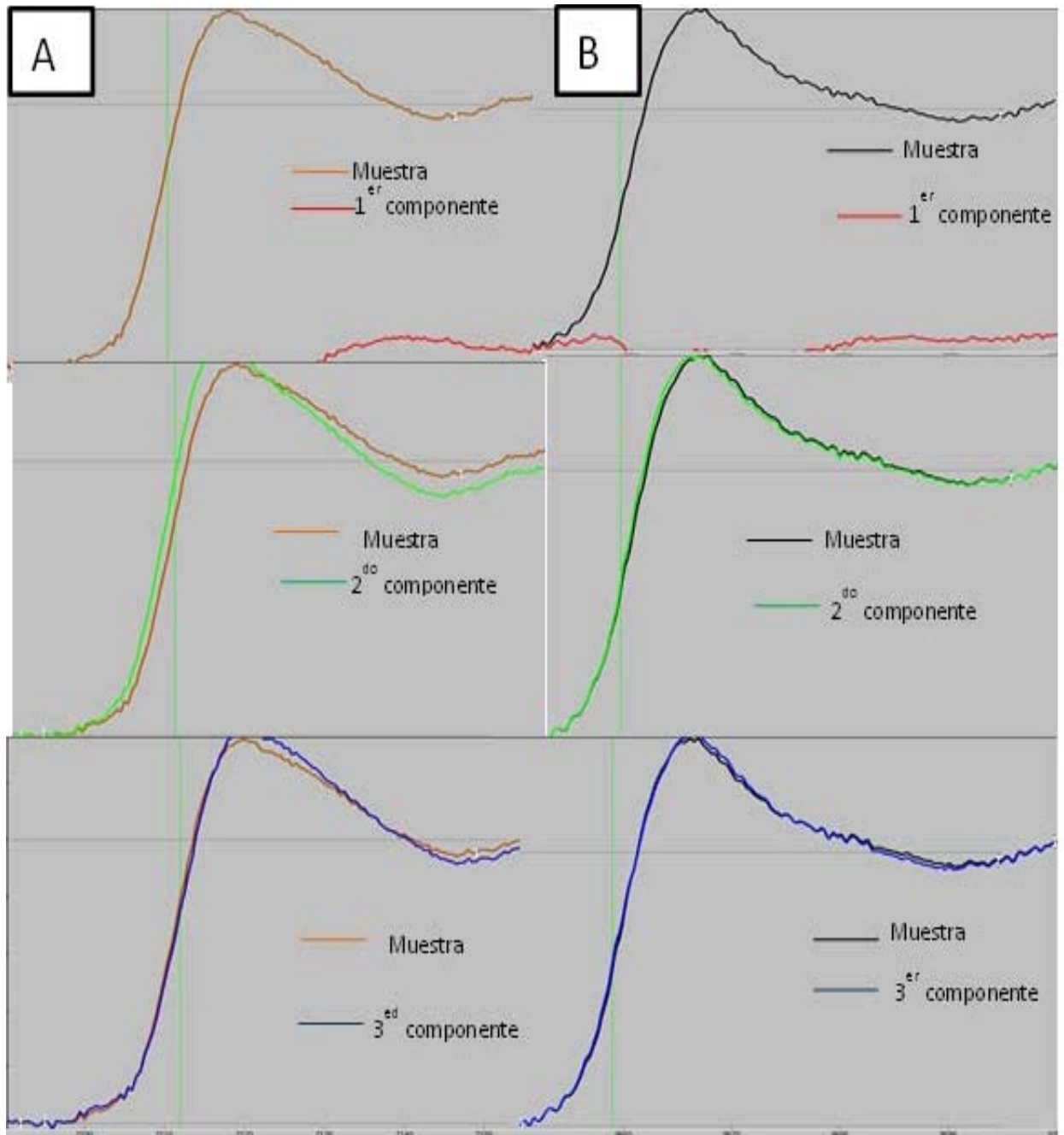


Figura 24. Componentes abstractas obtenidas mediante el análisis PCA, Fe (A) y Zn (B), Para la muestra 03 ma.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este resultado fue tomado como ejemplo ya que para las demás muestras se obtuvieron los mismos resultados, de tener 3 PCs y con un valor acumulativo de entre 90 % y 94 %.

Los valores de los porcentajes de las contribuciones obtenidos por medio del ajuste de la combinación lineal vienen dados en la figura 25, los valores con sus respectivas desviaciones estándar y los parámetros estadísticos del ajuste están en la tabla F, anexo VI.

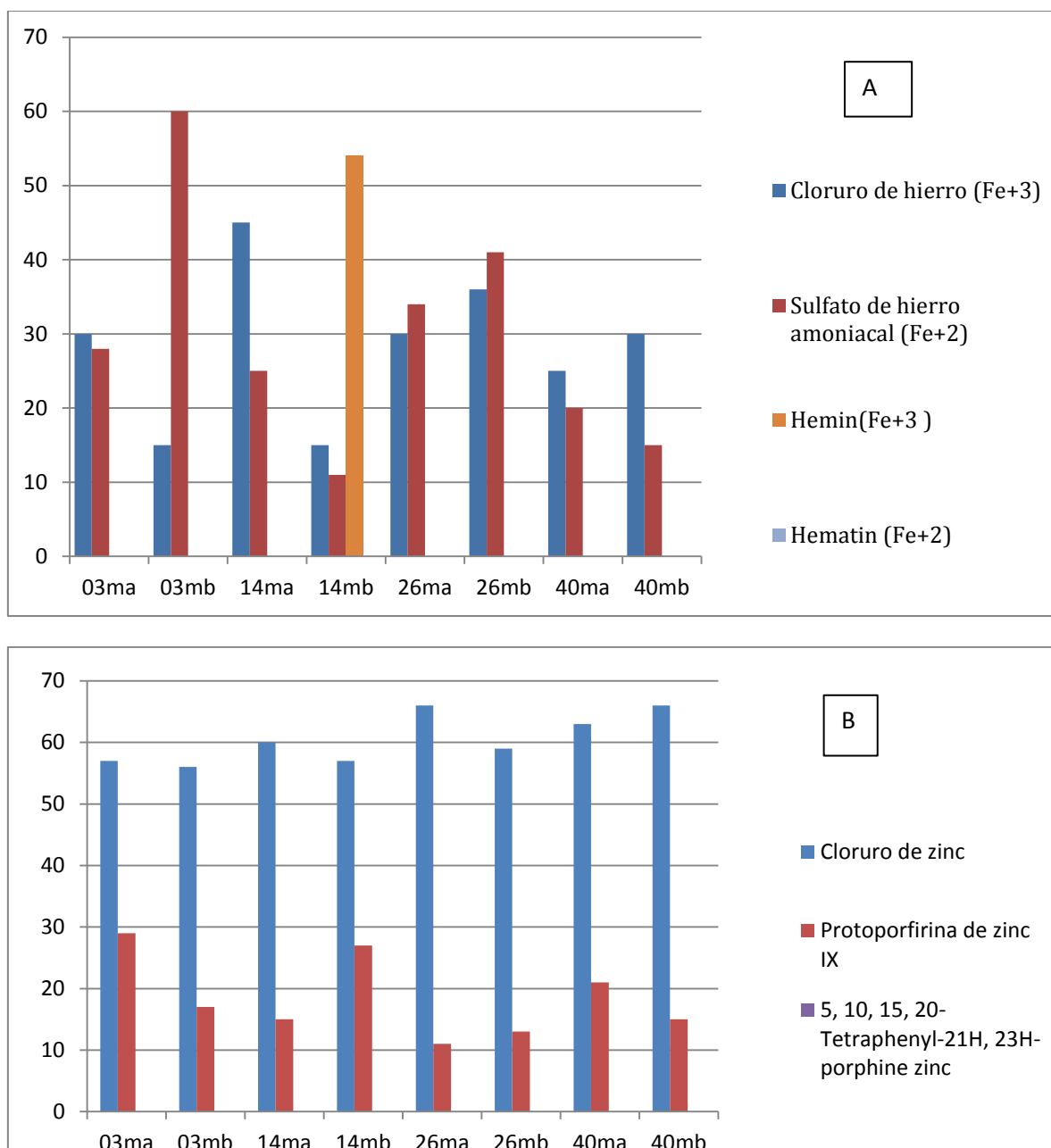


Figura 25. Distribución de los componentes obtenido en el análisis de LCF. Hierro (A), zinc (B).

Mediante el análisis de los espectros experimentales XANES en el borde K-Fe y K-Zn, pudimos encontrar modelos simples que pudiera explicar el entorno químico que rodea al hierro y zinc. Dentro de estos entornos podemos decir que:

- ✓ De acuerdo al análisis de PCA y TT realizado, las muestras de Fe revelan que hay un entorno cercano al Fe que no se ajusta a ninguna de nuestras referencias, y eso queda indicado en el análisis LCF, donde queda un pequeño porcentaje atribuido a alguna otra especie minoritaria de referencia o a la incertidumbre.
- ✓ Las muestras con menor tiempo de curación presentan mayores diferencias entre las regiones  $m_a$  y  $m_b$ , esto podría ser debido a que el proceso de proteólisis, deshidratación y absorción de sal poseen una notable influencia [6].
- ✓ El  $Fe^{+2}$  representado como sulfato, no hace pensar que es posible que el hierro de la hemoglobina haya podido unirse a fragmentos de aminoácidos formando así complejos estables cuya estructura sea parecida al de esta referencia.
- ✓ El  $Fe^{+3}$  inorgánico representado como cloruro, deja explicada claramente la teoría de Grau y col, [6], y otros investigadores [7], los cuales explican la relación de la absorción de sal, después del periodo de salación (aprox. 10 a 15 días), la proteólisis y la formación de compuestos no proteicos están relacionados con el proceso de curación y con las condiciones de pre-proceso, haciendo factible que la reorganización de los iones de  $Fe^{+3}$  sean captados por la electronegatividad de los iones de Cl dando como resultado formaciones parecidas en su estructura.
- ✓ La especie de Zn que está en mayoría es inorgánica, siendo la especie unida al cloro la que mantiene su porcentaje a través del tiempo de curado.
- ✓ La protoporfirina de Zinc es la especie que varios autores han descrito como la responsable de color de este tipo de jamón curado, solo en la muestra 03\_  $m_b$  su contribución es menor del 10%, para el resto se mantiene por encima de este valor, hecho que confirmaría la estabilidad del Zn mediante este complejo.

En cualquier caso, y para confirmar todas nuestras teorías un análisis de la región EXAFS fuera necesario, para obtener el mayor número de coordinación y las semejanzas de nuestros compuestos de referencia con las muestras. Adicionalmente, se debería estudiar la grasa del jamón curado, debido a la teoría que menciona la migración del compuesto porfirínico del Zn a esta zona y la explicación de la baja concentración de éste Zn en el musculo [8].

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.2 Moluscos

#### 4.2.1 Resultado del estudio mediante ICP-MS

En la tabla 5, se representan los resultados de concentración de los metales pesados, de todas las muestras.

Muestra	Elementos [ppm]						
	As	Se	Zn	Cr	Cu	Ni	Pb
Arcachón O-C	18	4,82	1882	1,0	121	1,0	1,1
Arcachón O-S.	23	4,69	2174	0,9	143	0,9	1,0
Arcachón M-S.	15	5,10	112	2,7	7,5	2,7	3,1
La Rochelle O-C.	15	2,96	1029	0,8	47	0,7	0,5
La Rochelle O-S.	19	4,53	2222	1,2	254	0,9	1,0
Ostranor O-S.	26	3,24	2128	1,0	67,5	0,6	1,2
Urdaibaï O-S.	22	3,08	1524	1,6	143	1,3	1,0
Sado O-S.	11	2,72	3858	1,0	630	1,9	0,5
Ebro M-C.	12	2,26	97	0,6	3,41	1,0	0,2
Aveiro O-C.	13	2,51	1273	0,6	67	1,0	0,8

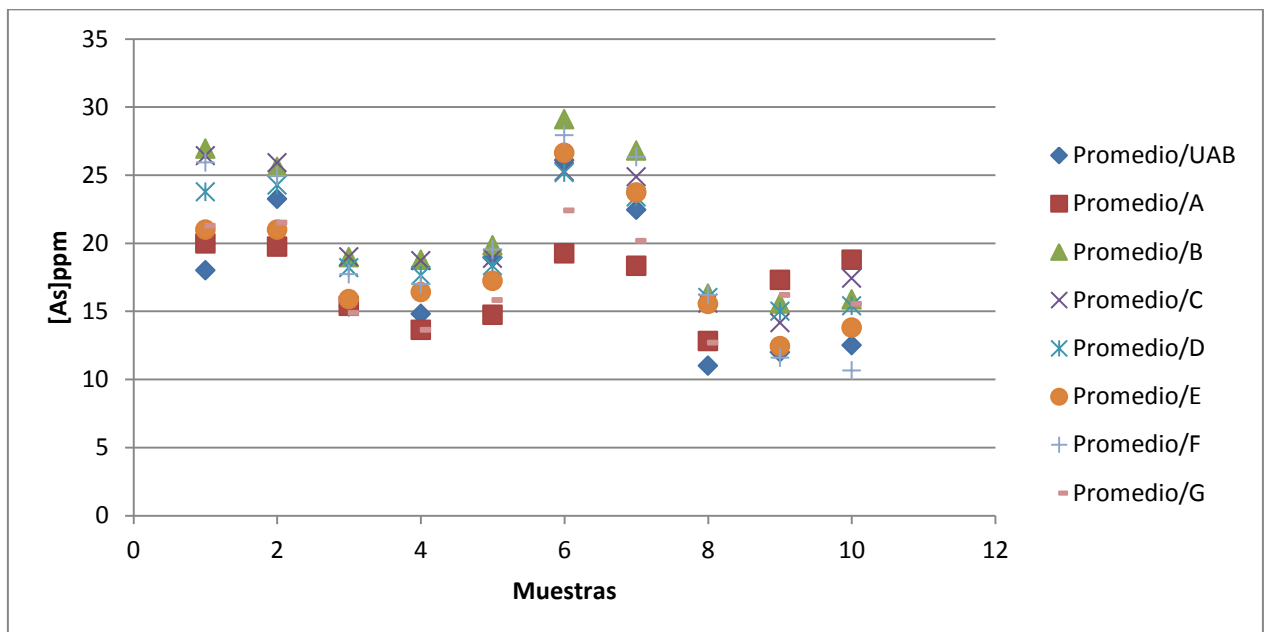
Tabla 5. Concentración total de los elementos analizados.

En base a los resultados obtenidos, las muestras Arcachón O-C, Arcachón O-S y Arcachón M-S, no hace diferencias entre las especies estudiadas ya que la relación de los metales es prácticamente la misma, siendo para Zn/Cu para todas las muestras aproximadamente 15:1, la relación entre As/Se en todas las muestras esta entre los valores 3:1≈ 5:1 y para los demás metales (Cr, Ni y Pb) el valor de su concentración esta entre 1y 3 ppm. No obstante, las proporciones no varían tanto en cuanto a la relación As/Se y Cr, Ni y Pb para el resto de las muestras. Es notoria la diferencia que hay en la relación Zn/Cu para las demás muestras, por ejemplo, la muestra francesa tomada en la costa de La Rochelle, para las ostras cultivadas (La Rochelle O-C) la relación Zn/Cu es de 22:1 y para las ostras libres (La Rochelle O-S) la relación es de 9:1, este mismo aumento se hace visible entre las muestras tomadas en los dos puntos del mar Cantábrico (Ostranor O-S y Urdaibaï O-S) y las muestras

portuguesas, Sado O-S y Aveiro O-C, la relación Zn/Cu es de 32:1 para las ostras cultivadas y para las ostras libres es 11:1, en Sado O-S, la relación Zn/Cu es de 6:1 y para Aveiro O-C es de 19:1, en caso la muestra Ebro M-C, esta relación es de 28:1, esta variación podría deberse a que la alimentación de las ostras cultivadas es mas rica en Zn que la media de los alimentos que las ostras libres encuentran en el mar [9].

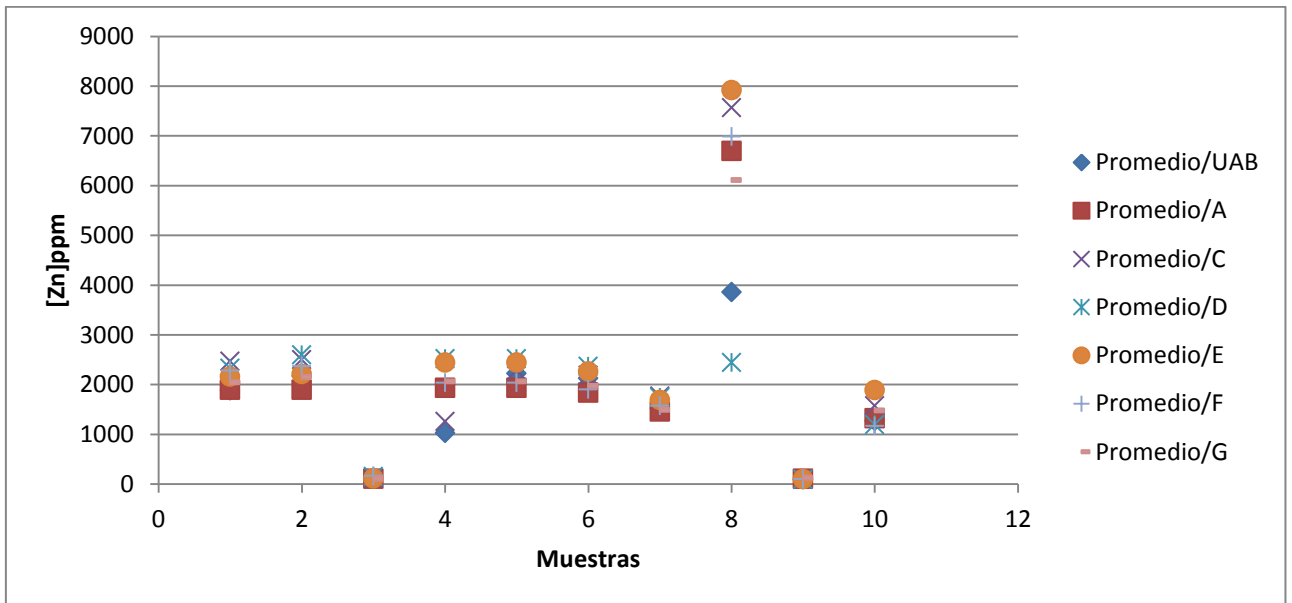
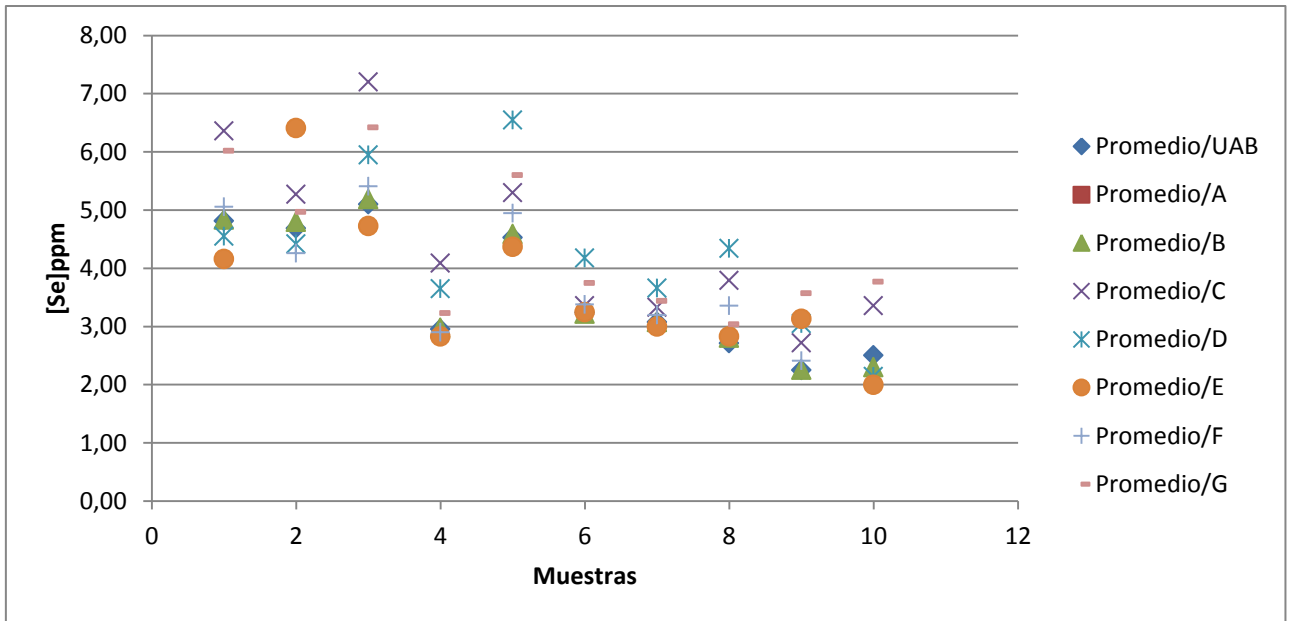
Con la finalidad de verificarr los resultados, y también las metodologías en los laboratorios participantes en el proyecto ORQUE\_SUDOE se ha realizado unejercicio interlaboratorio entre todos los participantes analíticos de dicho proyecto, donde se analizaron los resultados obtenidos del contenido metálico en las muestras estudiadas.

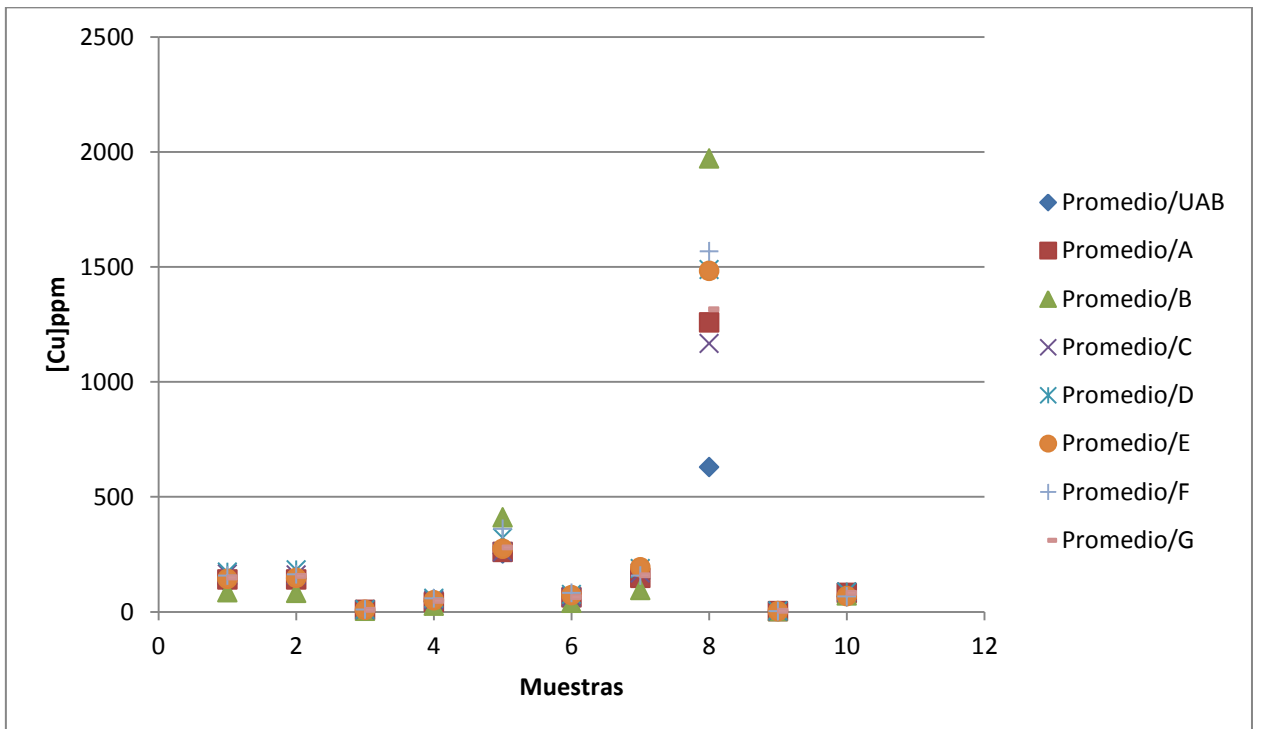
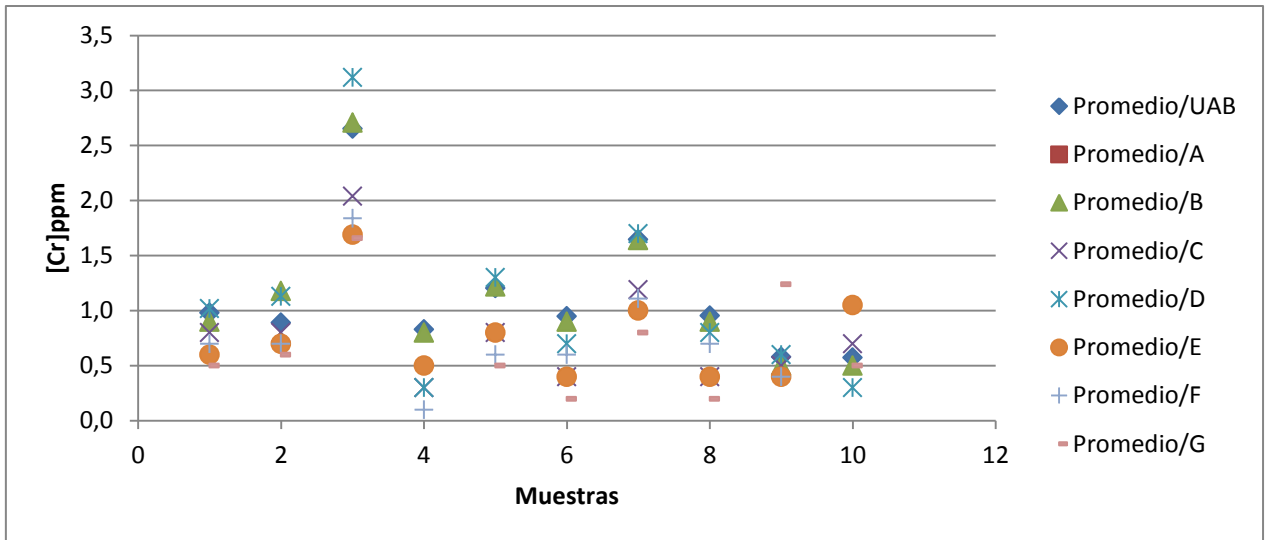
Los resultados del estudio comparativo entre los laboratorios participantes se encuentran en la figura 26.





#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN





#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

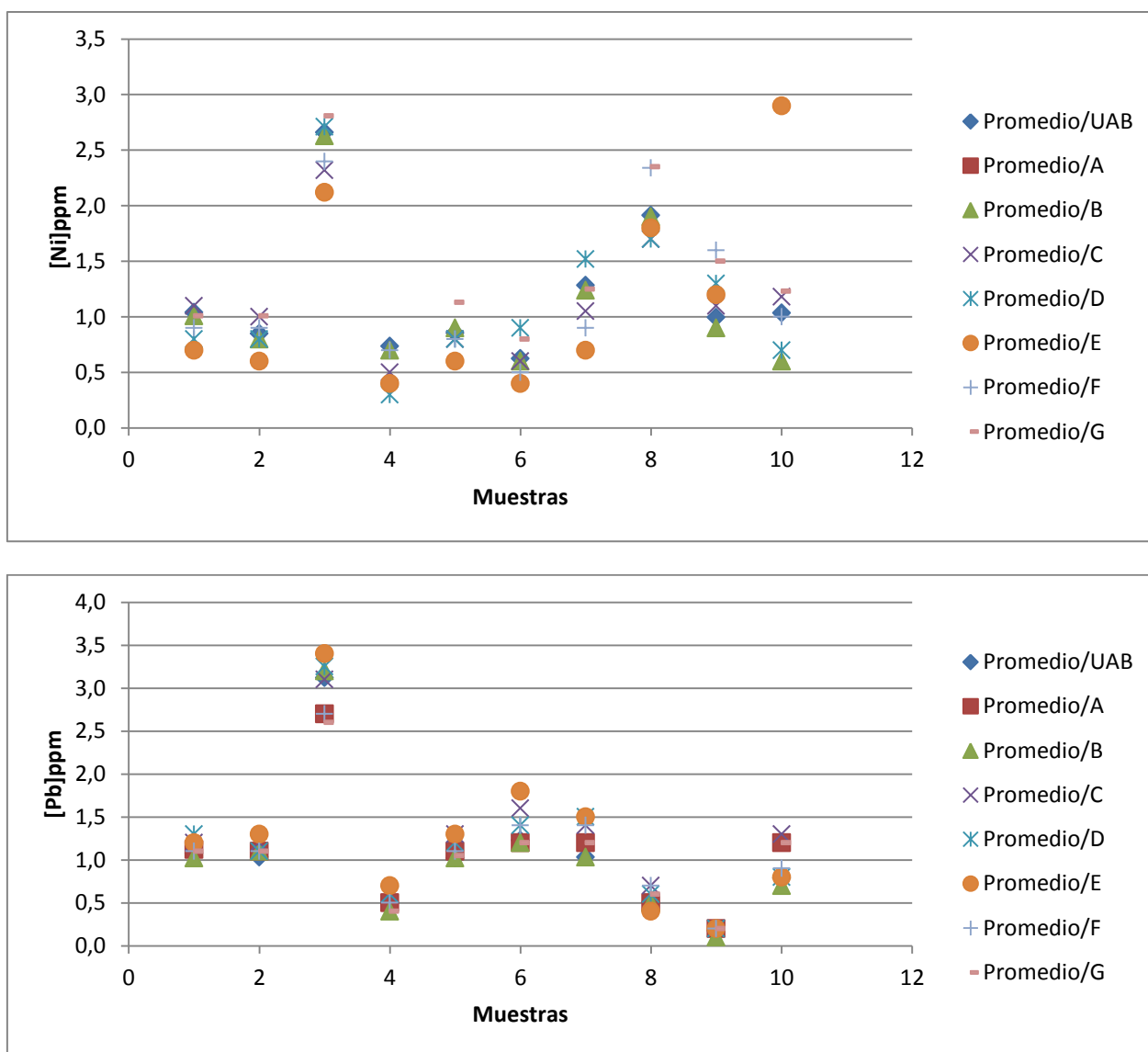


Figura 26. Intercorrelación de los diferentes resultados obtenidos por varias técnicas para cada elemento investigado de las 10 muestras de moluscos.

Las muestras de mejillones libres de la bahía de Arcachon, Francia (3) y de ostras libres correspondiente a la costa del río Sado, Portugal (8), son las que más variación han presentado entre los análisis del ejercicio de intercomparación. Este fenómeno podría ser atribuido a errores de homogeneidad de la muestra o también pudiera ser los valores extremos que estas muestras están presentando.

Como se ha visto anteriormente, solo las concentraciones de As, Zn y Cu pasan de los 10 ppm que es el límite de detección para el análisis de metales en muestras por medio de sincrotron.

A partir de los resultados obtenidos podemos decir que:

Como se puede observar cuando los organismos son cultivados la relación entre los metales va al aumento, esto podría ser debido

- En el caso del As, se ha demostrado que la absorción de este metal es directamente proporcional a la concentración de As en el medio [10], siendo que los niveles más altos de este metal han sido en muestras de ostras cultivadas en la costa de Ostranor y las menores concentraciones fueron de las muestras 8 y 9, correspondientes a ostras silvestres de la costa de Sado y a mejillones cultivados del Delta de Ebro. En una revisión de literatura, y con el objetivo de explicar esta diferencia de concentración se ha encontrado que la mayor actividad de la zona del Delta de Ebro es la agricultura y la pesca, por lo que hay más peligro de contaminantes de pesticidas que industrial y la ventaja de esta zona frente a las demás es que el cultivo de peces y otras especies hace que se vea reducida la concentración de metales pesados [11]. La zona del río Sado no tiene un gran caudal por lo que las especies marinas deben estar en situación de estrés provocando la hiperproducción de enzimas o mecanismos de defensa para sus organismos, por lo que su alta concentración en Zn puede estar asociado a este fenómeno. En los demás casos se ha comprobado, que muchas ostras reaccionan aumentando este elemento ya que sus funciones vitales se ven comprometidas aumentando así la concentración del Zn como elemento esencial. Un ejemplo de esto es en el año 2008, los investigadores de la universidad de Ostranor publicaban un comunicado de ostras deformes debido a la pintura de los barcos.
- En el caso del cobre, al igual que el Zn es un oligoelemento esencial, que está relacionado con numerosas enzimas y que puede servir de cofactor para la activación de enzimas asociadas al metabolismo oxidativo [10]. La concentración aproximada que puede llegar a fijar los moluscos, como es el caso de las ostras es de 60 mg por kilogramo de peso [12]. En nuestra dos muestras de mejillones (muestra 3 y 9) la concentración es mucho menor comparadas con las ostras, que incluso son del mismo lugar, deja a entender que las ostras tienen mayor grado de

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*fijación que los mejillones, aunque la biodisponibilidad sea la misma para ambas especies.*

- *En el ejercicio de intercomparación entre laboratorios, las concentraciones de As, para todas las muestras estuvieron con un margen de 0.6 % de desviación estándar, lo que demuestra la reproducibilidad de la concentración de este elemento. Solo dos laboratorios (UCM y UT2A) han especiado el As y la especie que se encuentra en mayor proporción es la arsenobetaina (80-90%) con una desviación estándar de 0.2%, lo que más adelante se corrobora con las especies encontradas mediante la técnica de sincrotrón.*
- *Para las concentraciones del Zn y Cu, la muestra 8 presentó valores distintos en sus concentraciones para todos los análisis realizados por los diferentes centros de investigación, es muy probable que esto sea debido a la interferencia entre estos metales.*

#### **4.2.2 Resultados del estudio mediante la técnica del sincrotrón**

##### **4.2.2.1 Resultado para el estudio del arsénico.**

*Los espectros tanto de nuestras muestras como las referencias se encuentran representadas en la figura 27, como se puede observar la especie  $As^V$  está más desplazada que las demás lo que indica que su estado de oxidación y entorno químico es muy diferente a nuestras muestras, sin embargo la especie dominante en cuanto a similitud es la arsenobetaina.*

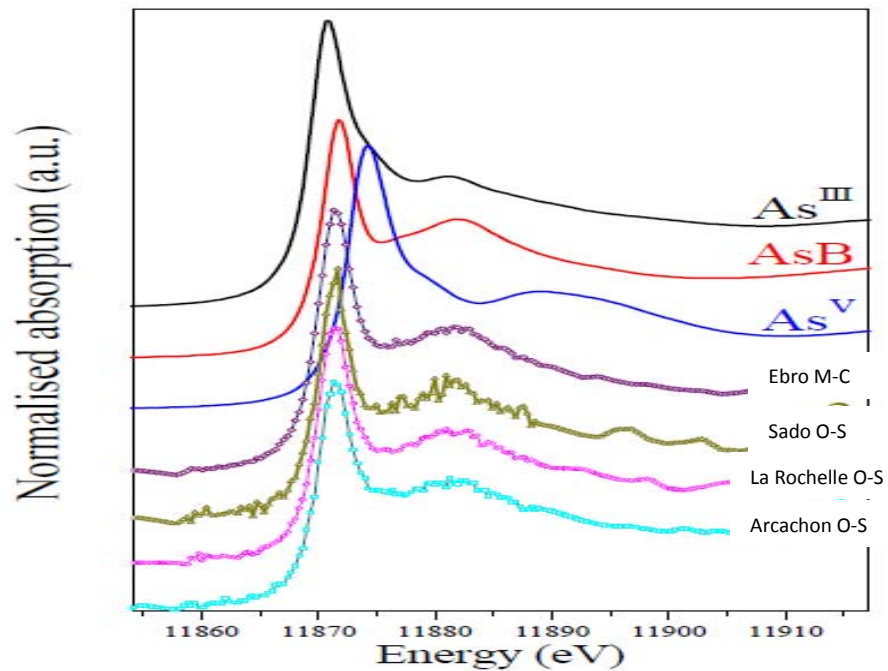


Figura 27. Espectros XANES en el borde K-edge del Arsénico de las referencias y las muestras de ostras y mejillones.

Como características de los espectros XANES, tanto las ostras como los mejillones presentan estructuras muy similares y a nivel del borde de absorción o "línea blanca", no se observa cambios significativos lo que se puede decir que todas las muestras presentan en proporción de mayoritaria a un mismo estado de oxidación el del AsB.

La técnica XANES detecta la presencia del estado de oxidación del As y el compuesto dominante, un análisis paralelo realizado por la UCM utilizando LC-ICP-MS, reportaba que los rangos de concentración de la arsenobetaina están comprendidos de un 60 a un 80% de la cantidad de arsénico total.

El ajuste de los espectros mediante la combinación lineal, demuestra lo que visiblemente se observaba al superponer los espectros, solo una pequeña cantidad corresponde a As III.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 6 se muestran los porcentajes obtenidos mediante la técnica XANES con sus desviaciones estándar.

Muestra	Parámetros	AsB	As <sup>III</sup>
Arcachón O-S	R=0.0208, X <sup>2</sup> =0.15, RX <sup>2</sup> =0.008	85±4	15±4
La Rochelle O-S	R=0.024, X <sup>2</sup> =0.38, RX <sup>2</sup> =0.010	71±6	29±12
Sado O-S	R=0.018, X <sup>2</sup> =0.05, RX <sup>2</sup> =0.0081	96±7	4±1
Ebro M-C	R=0.018, X <sup>2</sup> =0.30, RX <sup>2</sup> =0.010	75±5	25±5

Tabla 6. Resultados del ajuste de los espectros XANES por combinación lineal de los espectros de referencia y las muestras

En la figura 28, se muestran gráficamente los resultados del ajuste realizado con Athenas para calcular la especiación de arsénico en las muestras de ostras y mejillones, de los diferentes puntos de muestreo. El mismo tratamiento empleado, normalización y calibración de energía se utilizó para todos los espectros antes de hacer el ajuste en un rango de energía comprendido de 11847 hasta 11897 eV, incluyendo 129 puntos espectrales.

Un ajuste por combinación lineal, quiere decir, que se considera el espectro de la muestra directamente como la suma de los espectros de las referencias tratando de ajustar la fracción de cada componente en la suma.

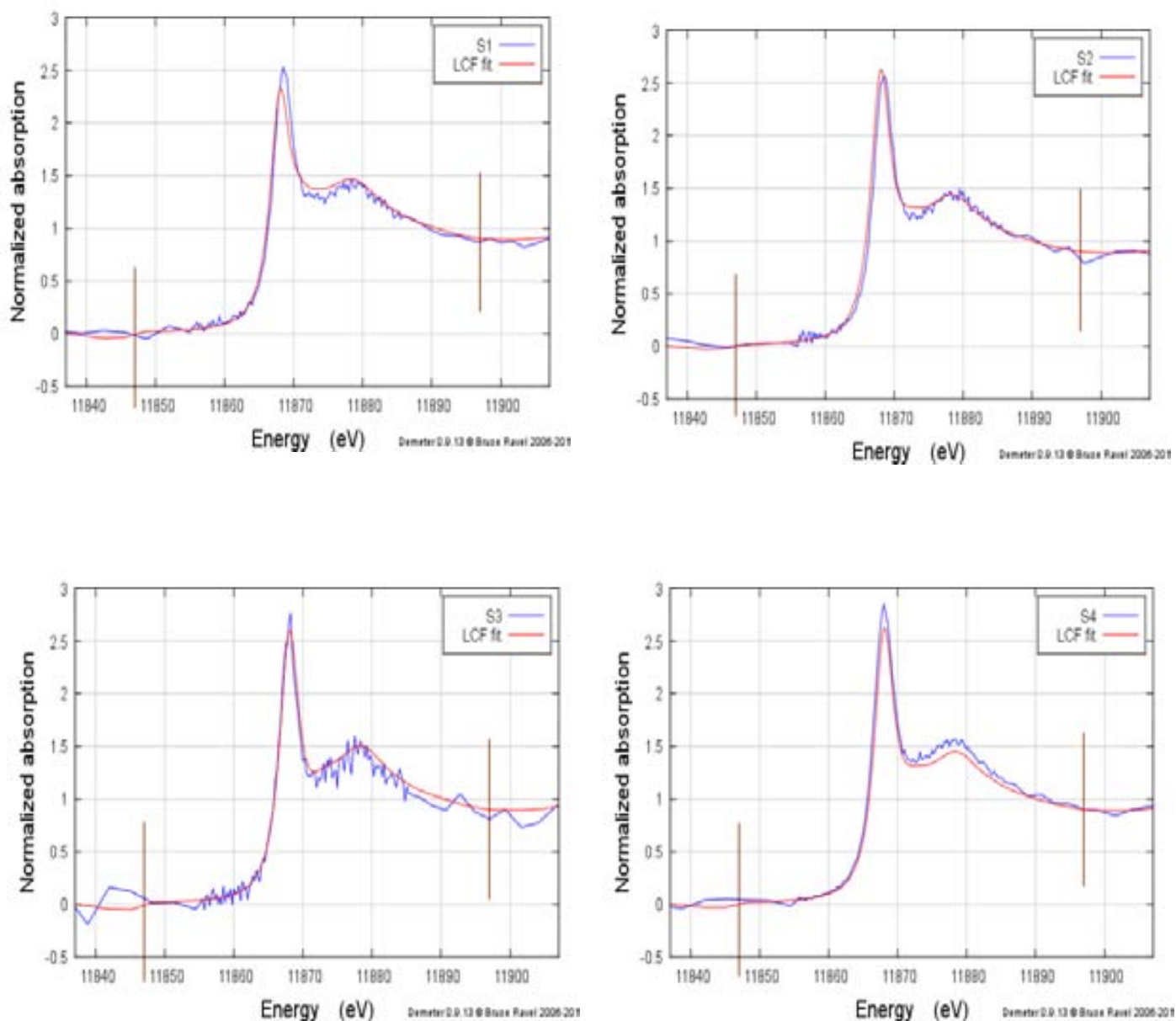


Figura 28. Espectros XANES (línea azul) y su ajuste por combinación lineal de los espectros de referencia (línea roja) de las muestras de ostras y mejillones para el As.

Para ninguna de las muestras estudiadas ha salido contenido de As(V), lo que significa que la especie predominante inorgánica del As es As(III), siendo las muestras de la bahía de Arcachon y la del Delta de Ebro las que más contienen esta forma química del arsénico. Es sabido que el arsénico trivalente se absorbe más rápidamente que el arsénico pentavalente



#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*en los sistemas biológicos, aunque ambos estados de oxidación inhiben los procesos energéticos vinculados a las funciones de la mitocondria.*

*Los compuestos de As(III) tienen una alta afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas provocando la desactivación de las enzimas y pudiendo afectar la actividad fisiológica o interactuar con los demás metales determinados en este estudio produciendo un desequilibrio interno [13].*

*No obstante, para todos los casos la arsenobetaina es el componente mayoritario en nuestras muestras, que es una especie considerada no tóxica y no perjudica a la salud del consumidor de los organismos que la contienen.*

*Como en primer lugar, se analizó la concentración total del arsénico y luego la especiación del mismo por espectros de absorción y cuyos porcentajes en el tratamiento del ajuste lineal ha sido corroborada con otros estudios de especiación por LC-ICP-MS, lo que demuestra que esta técnica es muy precisa a la hora de hacer especiación.*

*En base a los resultados obtenidos, podemos decir que:*

- ✓ Mediante el análisis de los espectros XANES en el borde K-As por tratamiento de ajuste por combinación lineal de los espectros de las referencias, pudimos observar la buena correlación con los resultados por especiación convencional respecto a la referencia dominante de arsenobetaina (AsB).*
- ✓ Adicionalmente, el ajuste de combinación lineal nos proporciona un porcentaje preciso de la influencia que posee las referencias usadas en cada una de nuestras muestras, siendo la AsB el componente mayoritario en todas ellas.*
- ✓ Las muestras obtenidas de la costa occidental de Francia, abiertas al mar atlántico, muestra interacción con respecto al contenido de As(III) con los demás metales, lo que significa que para la muestra Arcachón O-S que posee un 15% de As<sup>III</sup>, las concentraciones de Cu, Zn, Se, Cr, Ni, Pb, son menores que las posee la muestra La Rochelle O-S que contiene un 29% de As(III). Esta tendencia de estas muestras (ostras) provenientes de Francia, podría ser el resultado del impacto de esta especie que como mencionamos antes interfiere con algunos funcionamientos fisiológicos y de respuesta al estrés.*

#### 4.2.2.2 Resultados para el estudio del zinc.

En la figura 29, se muestran gráficamente los resultados del ajuste realizado con Athenas para calcular la especiación de zinc en las muestras de ostras y mejillones, de los diferentes puntos de muestreo. El mismo tratamiento empleado, normalización y calibración de energía se utilizó para todos los espectros antes de hacer el ajuste en un rango de energía comprendido de 9639 hasta 9709 eV, incluyendo 113 puntos espectrales.

En la tabla 7, se muestran los porcentajes obtenidos por el análisis de LCF.

Muestra	Parámetros	ZnCl2	ZnS	Zn6_Zn4/5	Zn3	Zn6
Arcachón O-S	R=0.0060, X <sup>2</sup> =0.14, RX <sup>2</sup> =0.001	12±1	22±6		39±18	27±4
La Rochelle O-S	R=0.0076, X <sup>2</sup> =0.17, RX <sup>2</sup> =0.0016	15±6	26±5		59±10	
Sado O-S	R=0.0073, X <sup>2</sup> =0.17 RX <sup>2</sup> =0.0015	17±6	22±5		61±15	
Ebro M-C	R=0.015, X <sup>2</sup> =0.33, RX <sup>2</sup> =0.002		31±6	39±9	30±18	

Tabla 7. Resultados del ajuste de los espectros XANES por combinación lineal de los espectros de referencia y las muestras.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

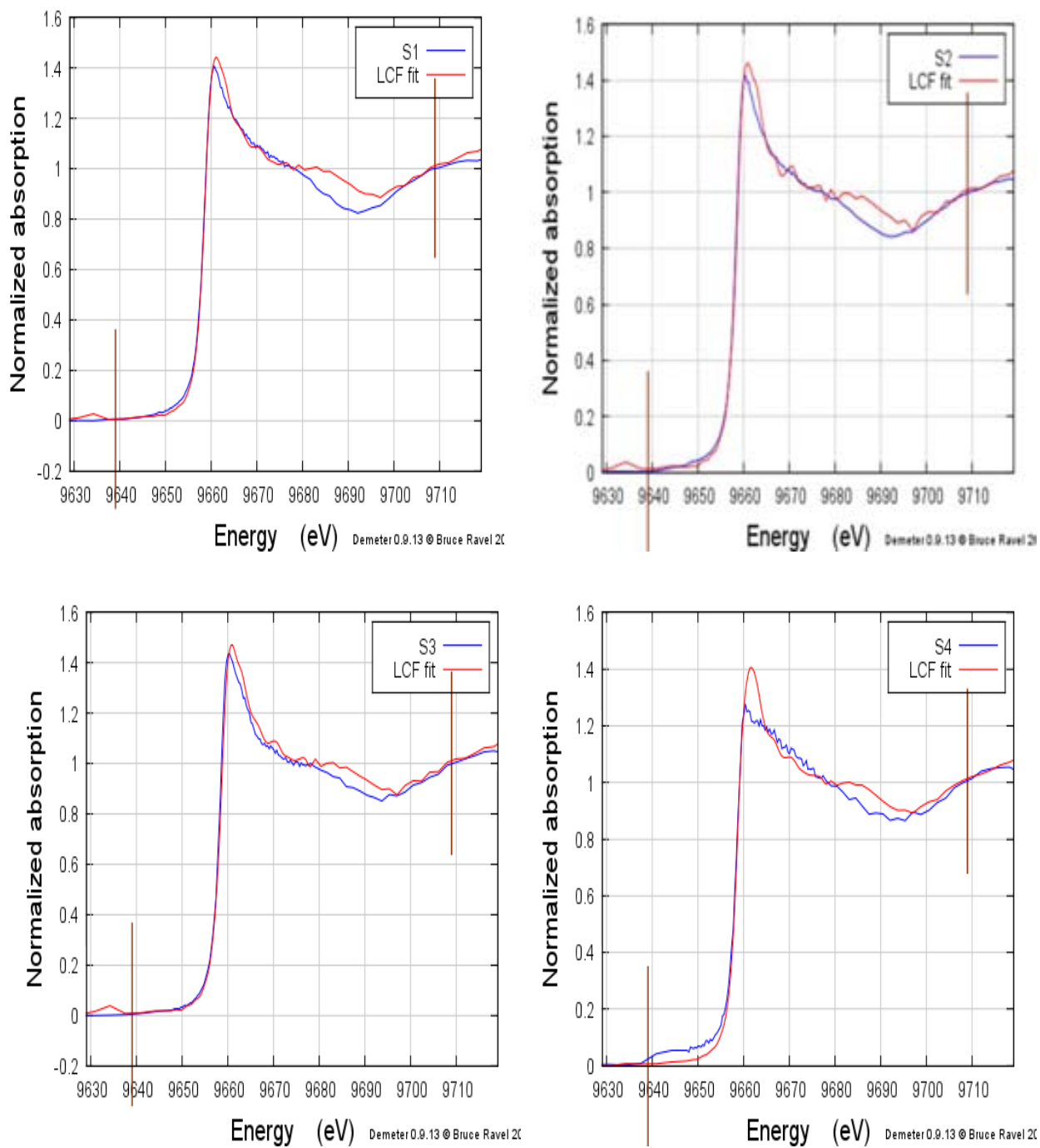


Figura 29. Espectros XANES (línea azul) y su ajuste lineal (línea roja) de las muestras de ostras y mejillones.

El resultado de la combinación lineal revela que las muestras poseen alrededor de un 30% a 40% de Zn que se puede considerar inorgánico, a pesar que para la estructura tetraédrica del ZnS pudiera considerarse como el anillo principal de la unión del clúster de las metalotioneinas, para el estudio en XANES, las distancias son muy importantes a tomar en cuenta y entre las coordinaciones Zn-S del sulfuro de zinc, las coordinaciones no son iguales para todos los lados y el azufre que está unido al zinc, no proviene de fragmento de aminoácidos, por lo cual lo hemos considerado como una referencia inorgánica.

Dentro del grupo de las metalotioneinas, la forma que aparece en todas es la que posee un solo clúster de 3, y luego para las Arcachón O-S y Ebro M-C presenta otras especies de metalotioneinas mixta de otros clústeres.

Sin embargo, si nos fijamos en las zonas de las muestras después del borde de absorción, las diferencias son notorias haciendo que no se ajusten ningunas de las referencias que hemos usado. La figura 30, muestra la parte después del borde EXAFS, donde se ve la explicación de estas diferencias.

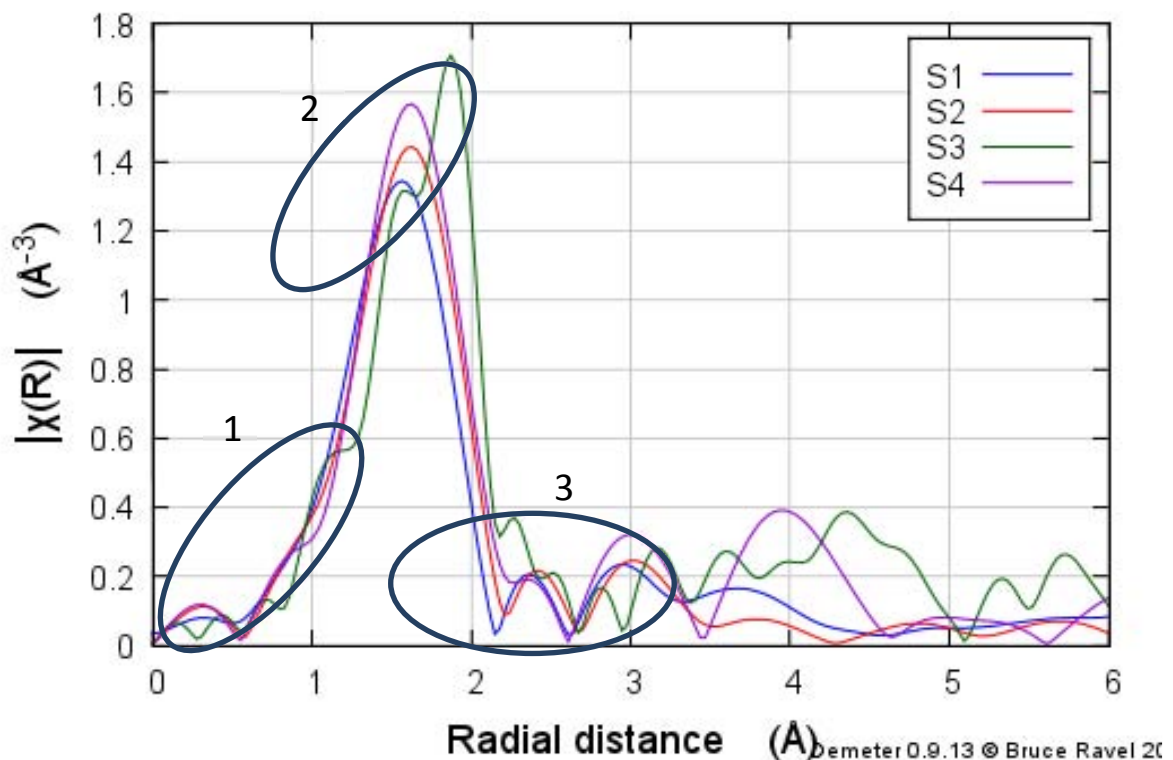


Figura 30. Región EXAFS (primera ondulación) de las muestras de ostras y moluscos.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre las comparaciones de las muestras, a nivel de baja intensidad de energía (figura 30; 1 y 2) de la región del espectro, hay unas ondulaciones que pueden ser atribuidas a coordinaciones que no están presentes en nuestras referencias (Figura 31) y que de hecho influye a que haya un desplazamiento y dispersión entre una muestra y otra.

Ningunos de los picos y ondulaciones son parecidas a nuestras muestras en esta parte, las muestras que presentan elevación en esta zona del espectro son ZnCl<sub>2</sub>, ZnS, y la metalotioneína mezcla Zn<sub>6</sub>\_Zn<sub>4/5</sub> y que tampoco son parecidas porque presentan otro tipo de ensanchamiento y dispersión, es posible que la distancias en estos compuestos están más juntos que nuestras muestras. Las posiciones de baja intensidad de energía (figura 31; 1 y 2) no poseen esa ondulaciones características de la repetición de grupos funcionales que posiblemente se encuentre formando parte de un sistema organizado de aminoácidos en nuestras muestras reales.

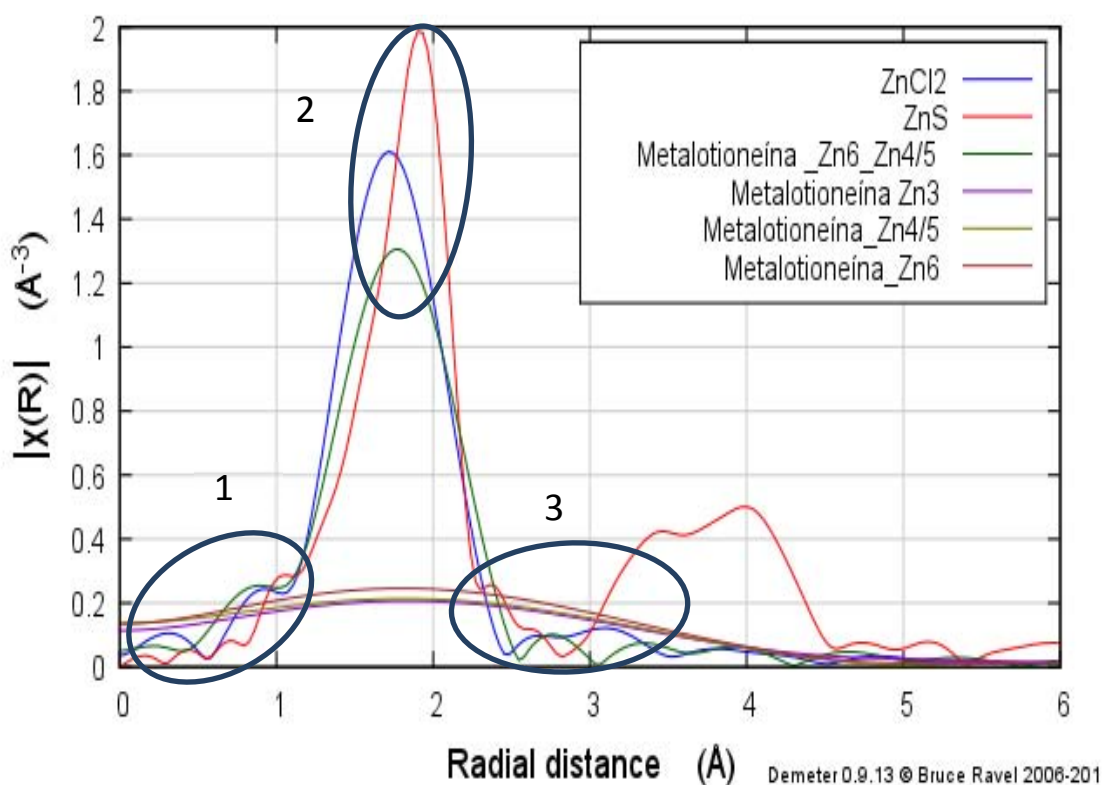


Figura 31. Región EXAFS (primera ondulación) de las referencias utilizadas en el ajuste para la especiación de nuestras muestras.

Los resultados obtenidos en el estudio de la especiación de Zn en las muestras representativas de algunas zonas de muestreo del proyecto ORQUE-SUDOE, revela que:

- ✓ En los moluscos estudiados, el porcentaje asociado a uniones de Zn con especies química inorgánicas, es prácticamente el mismo (30% a 40%) lo que significa que es muy probable que esta sea la forma de entrada de este oligoelemento a las células de estos organismo, ya que por su naturaleza anfótera, el zinc forma gran variedad de sales (como cloratos, cloruros, sulfatos, etc.) que son muy solubles en agua.
- ✓ La producción e identificación de las metalotioneinas ha revelado, en la comparación de las formas orgánicas del Zn, que más del 60% está en esta forma de Zn unido al átomo de azufre proveniente de la ruptura de aminoácidos y no de radicales inorgánicos sulfúricos.
- ✓ El hecho de que el ajuste de combinación lineal no se haya logrado por completo en las zona de EXAFS, donde se revelan las coordinaciones alrededor del átomo absorbente, efecto de dispersión o scattering, demuestra que existen más isoformas relacionadas a las metalotioneinas que no poseíamos a la hora de hacer el experimento, es probable que al estar presente el solo clúster de tres átomos de Zn, en todas nuestras muestras, este faltando un segundo clúster dentro de nuestras referencias de más de 3 ósea de 4, seria cuatro átomo de Zn enlazados a 4 átomos de azufre cada uno, que al unirlo a otro clúster de 3 pudiera formar una metaloproteína de 7 átomos de Zn. Tal como se hace referencia a la investigación realizado por Sigel A. y col [14-16].
- ✓ Este estudio será objeto de estudio para futuras investigaciones donde se probará que este efecto de dispersión es realmente por la ausencia de la referencia adecuada o por efectos de temperatura, por lo cual se ha diseñado otro experimento, donde se leerán las muestras a bajas temperaturas.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Referencias del capítulo

- [1] Fidel Toldrá, *Handbook of Fermented Meat and Poultry.*, 2007 Blackwell Publishing, pag.77-86
- [2] Voerkelius Susanne a,\*, Lorenz Gesine D. a, Rummel Susanne b, Quérel Christophe R. c, Heiss Gerhard d, Baxter Malcolm e, Brach-Papa Christophe c, Deters-Itzelsberger Peter b, Hoelzl Stefan b, Hoogewerff Jurian f, Ponzevera Emmanuel c, Van Bocxstaele Marleen c, Ueckermann Henriette ., *Strontium isotopic signatures of natural mineral waters, the reference to a simple geological map and its potential for authentication of food.*, *Food Chemistry* 118 (2010) 933–940
- [3] Aiello D., De Luca D., Gionfriddo E., Naccarato A., *Multistage mass spectrometry in quality, safety and origin of foods.* *Eur. J Mass Spectrom*, 17, 1-31 (2011)
- [4] Guerrero, L., Gou, P., Alonso, P., y Arnau, J., *Study of the physico-chemical and sensorial characteristics of dry-cured hams in three pig genetic types.* *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1996, 70, 526-530.
- [5] Sancho Banjoán ? Marjoa-Dolores Gil, Marjoa-Victoria Granados ? Marjoa-Dolores Garrido., *The effect of using PSE meat in the manufacture of dry-cured ham.*, *Z Lebensm Unters Forsch A* (1998) 206: 88±93
- [6] Rau´ l Grau a, William Albarraci´ n a, Fidel Toldra´ b, Teresa Antequera c, Jose´ M. Barat., *Study of salting and post-salting stages of fresh and thawed Iberian hams.*, *Meat Science* 79 (2008) 677–682.
- [7] Sancho Banjoán ? Marjoa-Dolores Gil, Marjoa-Victoria Granados ? Marjoa-Dolores Garrido., *The effect of using PSE meat in the manufacture of dry-cured ham.*, *Z Lebensm Unters Forsch A* (1998) 206: 88±93
- [8] J. Wakamatsu a,b,\*, H. Odagiri b, T. Nishimura a,b, A. Hattori, *Observation of the distribution of Zn protoporphyrin IX (ZPP) in Parma ham by using purple LED and image analysis.* *Meat Science* 74 (2006) 594–599.
- [9] Auffret M, Rousseau S, Bouteta I, Tanguya A, Baronb J, Moragaa D, Duchemin M, *A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean.* *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63 (2006) 393–405
- [10] Bears, H., Richards, J.G., Shulte, P.M., 2006. *Arsenic exposure alters hepatic arsenic species composition and stress-mediated gene expression in the common killifish.* *Aquat. Toxicol.*, 77, 257-266.
- [11] Kot, A., Namiesnik, J., 2000. *The role of speciation in analytical chemistry.* *Trends Anal. Chem.*, 19, 69-79.
- [12] Chang, L.W, 1996. *Toxicology of metals.* CRC, Boca Ratón, Florida, USA.
- [13] Wright, D., Welbourn, P., 2001. *Environmental toxicology.* Ed. Cambridge University Press, USA  
www.belt.es-legislación vigente, [http://www.belt.es/legislacion/vigente/Medio\\_ambiente/index.htm](http://www.belt.es/legislacion/vigente/Medio_ambiente/index.htm).
- [14] Bradl, H.B, Kim, C., Kramar, U., Stüben, D., 2005. *Heavy Metals in the environment.* Chapter 2: *Interactions of heavy metals.* Ed. H.B. Bradl
- [15] Sigel A, Sige Hl., Sige R. K. O., *Metal ions in life sciences, volume 5. Metallothioneins and related chelators.* *Met. Ions Life Sci.* 2009, 5, 199–237.
- [16] Vergani L., *Metallothioneins in Aquatic Organisms: Fish, Crustaceans, Molluscs, and Echinoderms* *Met. Ions Life Sci.* 2009, 5, 224–226.

**5.**

***CONCLUSIONES***

***GENERALES***





Los resultados más relevantes de los diferentes estudios realizados en este trabajo de investigación, se han presentado en sus correspondientes capítulos. En este apartado se enumeran las conclusiones de mayor relevancia en relación con los objetivos planteados en el capítulo 2.

En función de los resultados obtenidos en el procesamiento de datos obtenidos por HSI, técnicas sincrotrón y la especiación de isótopos de estroncio para el análisis y clasificación de las muestras alimentarias utilizadas y así como el estudio de la cuantificación de los niveles totales de los metales en estas muestras, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

### **MUESTRAS DE JAMÓN CURADO**

#### TÉCNICA HSI

- *La construcción de un modelo de clasificación entre dos tipos diferente de jamones curados realizado mediante la combinación de un sistema de imágenes hiperespectrales y métodos multivariantes de análisis estadístico, constituye una herramienta útil para la clasificación de jamones curados de diferentes países europeos.*
- *El uso de un análisis de componentes principales sobre diferentes partes de un mismo jamón curado, permite diferenciar las partes del jamón para poder seleccionar la parte más adecuada para los demás análisis en función de las necesidades de la técnica posterior.*
- *El modelo construido es funcional según verifican los rangos de los valores de predicción obtenidos para las clases estudiadas, los cuales poseen un margen de una unidad entre cada clase, con una desviación estándar mínima de 0.05 y máxima de 0.2 para todas las muestras que se utilizaron.*

#### TÉCNICA DE DILUCIÓN ISOTÓPICA

- *El estudio de la relación isotópica  $^{87/86}Sr$  para las muestras de jamón curado de diferentes orígenes Europeos muestra una relación con las concentraciones que se encuentran registradas en la literatura para muestras de agua y sedimento de las*

## 5. CONCLUSIONES GENERALES

respectivas regiones Europeas. Así, la relación isotópica para las regiones Italianas Parma y San Danielle es la misma que la que se encuentra en la literatura.

- Basados en el estudio de los valores de  $^{86/87}\text{Sr}$  se puede confirmar que es posible relacionar los jamones con cada una de las regiones involucradas y por consiguiente, asignar la identificación de las mismas. Este método conecta los parámetros del sistema de producción con los factores específicos de la región de origen pudiendo tratarse por tanto de un parámetro para una posible certificación de los jamones.
- Las similitudes de las relaciones isotópicas encontradas en las muestras de los jamones de diferentes tiempos de curado de Huelva, pueden indicar un cambio en el origen del cerdo o de la alimentación regular con que se alimentan los cerdos entre temporadas de montañera.
- Las regiones de Sevilla, Ávila y Badajoz presentan similitudes en sus valores  $^{87/86}\text{Sr}$ , en suelo agua y en algunos alimentos información que ha sido publicada por otros autores, notándose también esta similitud en nuestros resultados.

### TÉCNICA DE SINCROTRÓN

- En la búsqueda de biomarcadores para la trazabilidad del jamón curado, se propusieron hierro y zinc como posibles elementos.
- La especiación para el hierro se basa en sus estados de oxidación  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$ .
- Para  $\text{Fe}^{+2}$  no se encuentra ninguna especie orgánica mientras que la especie inorgánica identificada se comporta como el compuesto sulfatado amoniacal  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ , que pudo haber sido liberado en el proceso de proteólisis ya que su contribución en los espectros de las muestras va en descenso a medida que aumenta el tiempo de curación.
- Para el estado de oxidación  $\text{Fe}^{+3}$ , la especie inorgánica identificada es el cloruro de hierro (III), para el que se observa en muestras de los primeros meses de curación (03 a 14 meses) una mayor contribución en la parte externa del corte superficial del jamón, quedando proporcionados en los de más tiempo de curación (26 a 40 meses). Las especies orgánicas identificadas que representan al  $\text{Fe}^{+3}$ , son compuestos porfirínicos proteínicos de la carne, los cuales son la mioglobina y el

*hemin, siendo la mioglobina el compuesto que contribuye de manera mayoritaria en el proceso de curación.*

- *Los cambios en los estados de oxidación del Fe lo hacen ser un buen candidato como biomarcador de la trazabilidad del tiempo de curado.*
- *Para el Zn, la especiación se basa en las propiedades de las especies orgánicas e inorgánicas, donde dos especies inorgánicas representan la asociación de este elemento con iones cloruro y sulfato, y una especie orgánica representa la asociación del zinc con el núcleo porfirínico de las proteínas.*
- *Las contribuciones de las especies de zinc, no muestran diferencias significativas a largo del periodo de curación, por lo cual cualquier inestabilidad del mismo puede ser tomado como un desequilibrio producido por factores externos que no están asociados al proceso de curación del jamón curado.*

### **MUESTRAS DE MOLUSCOS**

#### **TÉCNICA SINCROTRÓN**

- *Se ha identificado la arsenobetaina como la principal especie de los arsénico contenidos en las muestras de moluscos. Su concentración en la muestra ha sido corroborada mediante otras técnicas de análisis, y cuyo rango se encuentra entre el 70% y el 96% del arsénico total.*
- *En el caso de zinc, más del 50%, de las contribuciones de las Zn-especies se debe a las metalotioneinas de diferentes clúster de zinc, al revelar que el átomo de Zn está unido a un átomo de azufre proveniente de la ruptura de aminoácidos y no de radicales inorgánicos sulfúricos.*